

Пермский государственный национальный исследовательский университет
Министерство образования и науки Пермского края
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления
рисками здоровью населения
МОО «Микробиологическое общество»
ООО «Имбиком»

СИМБИОЗ-РОССИЯ 2020

*Сборник статей XII Всероссийского конгресса
молодых ученых-биологов
с международным участием
(Пермь, 28–30 сентября 2020 г.)*



Пермь 2020

УДК 57+58+59+613

ББК 28.0

С37

Симбиоз-Россия 2020 : сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием (Пермь, 28–30 сентября 2020 г.) / Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Пермь, 2020. – 333 с.

ISBN 978-5-7944-3556-6

Сборник включает статьи XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2020».

Работы посвящены различным проблемам в области биологических наук: микробиологии и биотехнологии, ботаники и генетики, зоологии позвоночных и беспозвоночных, экофизиологии растений и экологии почв, фундаментальной и прикладной медицине. Статьи представляют интерес для специалистов, работающих в различных областях биологии, химии и медицины.

УДК 57+58+59+613

ББК 28.0

Издается по решению оргкомитета Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2020»

Главный редактор ***Н. Н. Паньков***

Редакционная коллегия:

***В. А. Черешнев, А. А. Елькин, И. Б. Ившина, А. Б. Крашенинников,
С. А. Овеснов, С. В. Боронникова, О. З. Еремченко, С. Л. Есюнин,
М. А. Бакланов, О. Ю. Устинова***

*Конференция проводится при финансовой поддержке
Министерства образования и науки Пермского края, договор о
предоставлении гранта на проведение научного мероприятия
№ Д-26/117 от 27.07.2020 г.*

ISBN 978-5-7944-3556-6

© ПГНИУ, 2020

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ОРГКОМИТЕТА:

Красильников Д.Г. д.пол.н., Врио ректора ПГНИУ, Пермь, Россия

ЧЛЕНЫ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСКОЙ ГРУППЫ ОРГКОМИТЕТА:

Бакланов М.А. к.б.н., заведующий кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия
Боронникова С.В. д.б.н., заведующая кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия
Бочарова А.М. начальник отдела по развитию высшего образования и науки
Министерства образования и науки Пермского края, Пермь, Россия
Пьянков С.В. д.г.н., проректор по научной работе и инновациям ПГНИУ, Пермь,
Россия
Гаврин А.Ю. PhD, научный сотрудник Кембриджского университета, Кембридж,
Великобритания
Демаков В.А. чл.-корр. РАН, директор
“ИЭГМ УрО РАН”, Пермь, Россия
Еремченко О.З. д.б.н., заведующая кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия
Есюнин С.Л. д.б.н., заведующий кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия
Жук В.В. к.б.н., доцент, зам. декана по внеучебной работе биол. ф-та ПГНИУ,
Пермь, Россия
Ившина И.Б. академик РАН, зав. лаб. “ИЭГМ УрО РАН” профессор ПГНИУ,
Пермь, Россия
Календарь Р.Н. к.б.н., заведующий лабораторией геномики растений и
биоинформатики РГП «Национальный центр биотехнологии», Нур-
Султан, Казахстан
Каннингхем К.Д. PhD, директор компании “Ресурсные решения Файфа”,
эксперт Европейской комиссии по программе “Horizon 2020”,
Эдинбург, Великобритания
Овеснов С.А. д.б.н., профессор, зам. декана по научной работе биол. ф-та ПГНИУ,
Пермь, Россия
Паньков Н.Н. проф., и.о. декана биологического факультета ПГНИУ, Пермь,
Россия
Санникова Т.М. генеральный директор ПДНТ “Губерния”, Пермь, Россия
Старчич Эрьявец М. PhD, профессор Люблянского университета, Любляна, Словения
Устинова О.Ю. д.м.н., заведующая кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия
Черешнев В.А. академик РАН, гл. науч. сотр. ИИФ УрО РАН, зав. кафедрой
ПГНИУ, Екатеринбург, Пермь, Россия
Чипурин А.В. директор МАОУ “Лицей № 2”
Шумихин С.А. к.б.н., директор учебного ботанического сада ПГНИУ, Пермь,
Россия
Щетко В.А. к.б.н., начальник НПЦБ ГНУ «Институт микробиологии НАН
Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

ЧЛЕНЫ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ ОРГКОМИТЕТА:

Березин Д.И. студент ПГНИУ, Пермь, Россия
Боталова К.И. ассистент ПГНИУ, Пермь, Россия
Елькин А.А. к.б.н., с.н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Крашенинников А.Б. к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия; с.н.с., ИБПС ДВО РАН,
Магадан, Россия
Арисова А.К. аспирант ПГНИУ, Пермь, Россия
Бажутин Г.А. аспирант ПГНИУ, Пермь, Россия
Васильева Ю.С. к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Ефимик Е.Г. к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Заморина С.А. д.б.н., в.н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, профессор ПГНИУ, Пермь, Россия
Крайнева Т.С. ассистент, ПГНИУ, Пермь, Россия

Кузнецова М.В.	д.м.н., в.н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, ПГМУ им. им.ак. Е.А.Вагнера, Пермь, Россия
Кузнецова Т.В.	зам. декана по учебной работе ПГНИУ, Пермь, Россия
Литвиненко Л.В.	к.б.н., н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, Пермь, Россия
Максимов А.Ю.	к.б.н., с.н.с. “ИЭГМ УрО РАН, доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Матвеева Г.К.	к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Пахоруков И.В.	аспирант ПГНИУ, Пермь, Россия
Пелеева А.Р.	магистрант ПГНИУ, Пермь, Россия
Сайдакова Е.В.	к.б.н., н.с. “ИЭГМ УрО РАН”, доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Селезнева А.А.	магистрант ПГНИУ, Пермь, Россия
Тищенко А.В.	аспирант ПГНИУ, Пермь, Россия
Ушаков В.Ю.	к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Храмцов П.В.	к.б.н., н.с. ИЭГМ УрО РАН, доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Чертов Н.В.	магистрант ПГНИУ, Пермь, Россия
Чертова М.А.	к.б.н., зам. директора учебного ботанического сада ПГНИУ, Пермь, Россия
Чудинов В.С.	директор ООО “Имбиоком”, Пермь, Россия
Шибанова Н.Л.	к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия

PREPARATION OF CIPROFLOXACIN RESISTANT *Escherichia coli* STRAIN N4i

Drčar P., Starčič Erjavec M.

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Keywords: antibiotic resistance, bacterial transduction, bacteriophage P1, ciprofloxacin, *Escherichia coli*, UPEC

Background: World health organisation's data show that resistance against antibiotics and antimicrobial agents is one of the largest threats to worldwide health, food security and development [1]. Bacterial infections, which were easily cured with available antibiotics are nowadays becoming a large economic burden and are in some cases even lethal. To combat this problem we need new antimicrobial agents. One of possible solutions could be a conjugation-based antimicrobial system. *E. coli* strain ŽP was constructed by adding ColE7 immunity gene to bacterial chromosome and ColE7 activity gene to a conjugative plasmid. This strain acts as a donor in conjugation [2]. To easily follow the conjugative transfer and make selection, a further genetic change in the constructed donor strain was needed – insertion of a ciprofloxacin resistance gene. Hence, the aim of this work was to construct such a strain. Ciprofloxacin-resistant uropathogenic *E. coli* strain, DL39, was used as the donor of the ciprofloxacin resistance gene and the P1 bacteriophage as the vehicle in bacterial transduction. The success of the horizontal transfer of the ciprofloxacin resistance genes from DL39 strain into N4i strain was assessed with conjugation assays.

Methods:

Strains and growth conditions:

Strains used in this study are listed in Table 1. Strains were grown on LB plates or liquid LB medium supplemented with appropriate antibiotics and incubated at 37 °C. In case of liquid medium the cultures were grown with aeration at 180 rpm.

Table 1

Bacterial strains used in this study with relevant characteristics

<i>E. coli</i> strain	Characteristics	Reference or source
DL39	Ciprofloxacin-resistant UPEC strain isolated from patient with an urinary tract infection	Rijavec et al., 2006; [3]
MC4100	Streptomycin-resistant laboratory strain	Casadaban M. J., 1976; [4]
J53	Sodium azide-resistant strain	Jacoby and Han, 1996; [5]
MSE259	Chloramphenicol-resistant strain with plasmid pOX38 without ColE7 activity gene	Starčič Erjavec et al., 2015; [2]
ŽP	Chloramphenicol-resistant strain with plasmid pOX38a with ColE7 activity gene	Starčič Erjavec et al., 2015; [2]
PDC39	Ciprofloxacin-resistant strain	This study
KPC39	Ciprofloxacin- and chloramphenicol-resistant strain with plasmid pOX38 without ColE7 activity gene	This study
ŽPC39	Ciprofloxacin- and chloramphenicol-resistant strain with plasmid pOX38a with ColE7 activity gene	This study

Appropriate antibiotics were added to the growth medium in following concentrations: ciprofloxacin (Cip) - 2 µg/ml, streptomycin (Sm) - 150 µg/ml, sodium azide - 170 µg/ml, chloramphenicol (Cm) - 25 µg/ml.

Confirmation of chromosomal encoded ciprofloxacin resistance:

Initially the ciprofloxacin-resistant phenotype of DL39 was confirmed by growing the strain in presence of Cip. Subsequently, the strain was analysed for possible conjugative plasmids by plasmid isolation and plate mating assays to assure that ciprofloxacin resistance gene was encoded on chromosomal DNA rather than on a plasmid. For plasmid isolation 2 ml of overnight bacterial DL39 culture was used and the plasmid DNA was isolated by the alkaline lysis protocol as described in Sambrook and Russel (2012) [6]. Finally the precipitated plasmid DNA was dissolved in 25 µl of TE buffer with RNase and kept at – 20 °C until usage. Sample of the finally obtained isolate was analysed with 1 % agarose gel electrophoresis in TBE buffer and visualised by G BOX (Syngene, Great Britain).

Phage transduction:

P1 was propagated on MC4100 as described by Miller H. (1972) [7] in order to obtain high enough phage titre. Subsequently, the P1/DL39 bacteriophage lysate was prepared as described by Miller H. (1972) with few exceptions. DL39 was grown in minimal medium instead of LB. Bacterial cultures were grown either overnight or over two nights and next day or after 2 days diluted 1:500 into fresh minimal medium and incubated for 6 hours. Further exception was that minimal 10A plates were used instead of R plates. Transduction of P1/DL39 ciprofloxacin resistance gene into N4i strain was essentially performed as described by Miller H. (1972) [7] with the following modification: the strains N4i was grown overnight in minimal medium A10 and next day diluted 1:500 into fresh minimal medium and incubated for 6 hours. To perform selection after transduction LB Cip plates were used.

Plate mating assay:

The plate mating experiments were performed as described in Starčič Erjavec et al. (2015) [2]. The DL39, MSE259 or ŽP strain was used as the donor and the J53 or PDC39 strain as the recipient.

Quantitative conjugation assay in liquid medium:

Quantitative conjugation assay in liquid medium was carried out as described in Starčič Erjavec et al. (2015) [2]. In order to calculate the conjugation frequency after the 6h-incubation period of the conjugation mixture, the CFUs of the donors, recipients and transconjugants were determined at t_0 (start of the 6h-incubation for conjugative transfer) and t_6 (end of the 6h-incubation for conjugative transfer). The quantitative conjugation assay was performed twice.

Results:

Initial confirmation of chromosomal encoded ciprofloxacin resistance was done by growth on LB Cip plate, plasmid isolation by alkaline lysis and plate mating assays. As the ciprofloxacin-resistant phenotype was confirmed and no (conjugative) plasmids detected, the DL39 strain was used in further experiments as the donor strain of ciprofloxacin resistance gene in P1 transduction.

P1 was successfully propagated on DL39 strain (Fig. 1A), and the obtained P1/DL39 lysate used for ciprofloxacin resistance gene transduction into N4i. Transduction into N4i strain resulted in one single colony, which was successfully propagated on LB Cip plate - the obtained strain was designated PDC39 (Fig. 1B).

In order to transfer the plasmids pOX38 and pOX38a into the PDC39 strain, conjugation of PDC39 strain with MSE259 and ŽP strain was done. Obtained strains were designated KPC39 (PDC39 with pOX38) and ŽPC39 (PDC39 with pOX38a) and used in conjugation assay with MC4100 – obtained results (number of CFU and calculated titre) are gathered in Table 2.

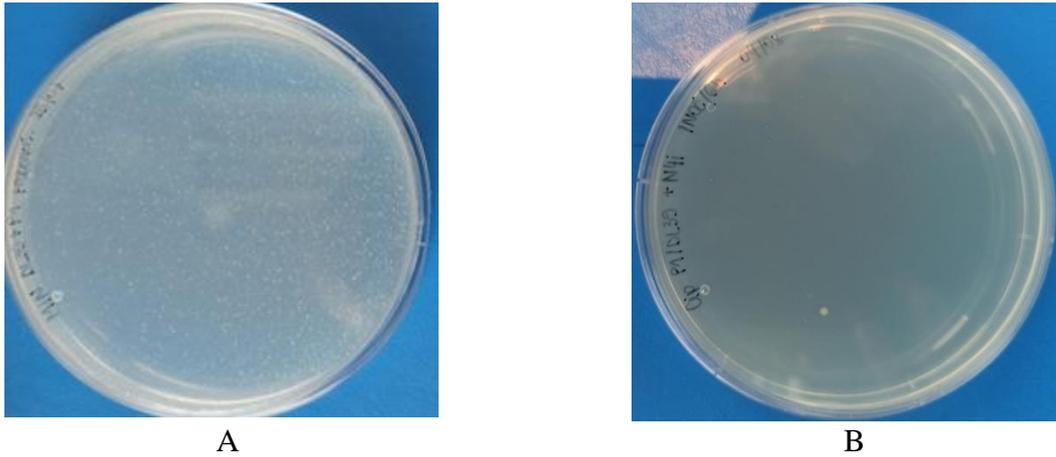


Figure 1: **A:** P1 infection of DL39 showed clear lysis on minimal 10A plates; **B** Transduction of P1/DL39 into N4i resulted in one single colony on LB plate supplemented with ciprofloxacin.

Table 2

Average CFU titre of two separate quantitative conjugation assays with KPC39 or ŽPC39 and MC4100

KPC39 × MC4100	CFU at time t ₀ , per se			CFU at time t ₆ , per se			CFU at time t ₆ in conjugation mixture		
	CFU rec	CFU don	CFU tc	CFU rec	CFU don	CFU tc	CFU rec	CFU don	CFU tc
Titer	1.8×10 ⁸	5.9×10 ⁸	n.o.	2.1×10 ⁸	5.2×10 ⁸	n.o.	1.7×10 ⁸	1.4×10 ⁸	1.6×10 ⁴
Conjugal frequency: 9.4×10 ⁻⁵ (per CFU of the recipient) and 1.1×10 ⁻⁴ (per CFU of the donor)									
ŽPC39 × MC4100	CFU at time t ₀ , per se			CFU at time t ₆ , per se			CFU at time t ₆ in conjugation mixture		
	CFU rec	CFU don	CFU tc	CFU rec	CFU don	CFU tc	CFU rec	CFU don	CFU tc
Titer	3.9×10 ⁸	1.1×10 ⁸	n.o.	6.1×10 ⁸	2.6×10 ⁸	n.o.	3.7×10 ⁸	1.5×10 ⁸	0
Conjugal frequency: 0									

Used abbreviations: rec – recipient; don – donor; tc – transconjugant; n.o. – no colonies observed (a control plate).

As seen from Table 2, the frequency of conjugation could be calculated in quantitative conjugation assay with strain KPC39 as the donor and strain MC4100 as the recipient. However, in case when strain ŽPC39 was the donor and strain MC4100 was the recipient we did not obtain any transconjugant CFU and therefore the conjugal frequency was zero. Results are comparable to the ones obtained in a similar study conducted by Starčič Erjavec et al. (2015). When in conjugation assays a strain with *colE7a* gene encoding the ColE7 DNase on a conjugative plasmid (ŽPC39 in this study and ŽP in the study conducted by Starčič Erjavec et al. (2015)) is used as donor, the recipient is after conjugal transfer of the *colE7a* gene killed, due to *colE7a* expression in the recipient.

Conclusions:

Based on our results it can be concluded that a ciprofloxacin resistant N4i strain was successfully obtained, however further experiments are needed to confirm its construction.

Acknowledgments:

This work was partially supported by the Slovenian Research Agency (P1-0198) and partially supported by the Government of Perm Krai (C-26/792).

References:

- [1] Antibiotic resistance. WHO. 2018. World health organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (18. Sept. 2020)
- [2] Starčič Erjavec, M., Petkovšek, Ž., Kuznetsova, M. V., Maslennikova, I. L. in Žgur-Bertok, D. 2015. Strain ŽP – the first bacterial conjugation-based “kill” – “anti-kill” antimicrobial system. *Plasmid*, 82: 28-34
- [3] Rijavec, M., Starčič Erjavec, M., Ambrožič Avguštin, J., Reissbrodt, R., Fruth, A., Križan-Hergouth, V., Žgur-Bertok, D. 2006. High prevalence of multidrug resistance and random distribution of mobile genetic elements among uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) of the four major phylogenetic groups. *Current microbiology*, 53: 158-162
- [4] Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of molecular microbiology*, 13: 313-326
- [5] Jacoby, G. A., Han, P. 1996. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 34: 908-911
- [6] Sambrook, J., Russel, D. W. 2012. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th edition. New York. Cold spring harbor laboratory press, 2272 pgs.
- [7] Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. New York. Cold spring harbor laboratory, 466 pgs.

IN VITRO PATHOGENICITY AND CYTOKINE RELEASE ASSESSMENT OF AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ON THE BIOMIMETIC PORCINE UROTHELIUM MODEL

Predojević L¹, Kreft ME², Keše D², Kuznetsova MV³, Starčič Erjavec M¹

¹*Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia,*

²*Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia,*

³*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm, Russian Federation*

Keywords: UPEC, cytokine, zoonotic potential, viability, cell culture

Background:

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), the *E. coli* associated with infections in wild and domestic birds (chickens, ducks, turkeys and geese), causes considerable financial losses in the poultry industry [1]. In addition, as APEC are closely related to human uropathogenic *E. coli* (UPEC), they also pose a serious risk to human health due to the possible transmission from birds to humans [1, 2, 3]. Our aim was to use the established biomimetic porcine urothelium model, a simple, fast, cost-effective and medically relevant model to study human UPEC pathogenicity [4], to evaluate APEC pathogenicity for humans. Furthermore, the cytokine production in response to the infection of the model with APEC strains was investigated.

Methods:

The biomimetic urothelium model based on normal porcine urothelium cells (NPU cells), previously established and evaluated employing human *E. coli* strains (Predojević et al., 2020), was used to study the pathogenic effect of two types of avian *E. coli* strains: APEC strains isolated from the internal organs of infected broilers (6 different strains) and commensal *E. coli* fecal strains

(AFEC) isolated from the feces of healthy birds (also 6 different strains). Two well-described human uropathogenic strains J96 and 536, as well as laboratory *E. coli* strain MG1655 and the natural human commensal strain SE15 isolated from the feces of a healthy person, were used as control strains. In short, the bacterial strains were incubated in LB medium and then diluted to obtain the multiplicity of infection 1:10. Bacterial suspensions prepared in NPU cell culture medium were applied onto the *in vitro* model and incubated for 3h. After the incubation period, the supernatant was collected, the NPU cells of the *in vitro* model were washed and finally treated with a mixture of enzymes for breaking down the proteins of cell-to-cell junctions in order to obtain individual NPU cells. Subsequently, the suspension of NPU cells was stained with trypane blue dye and NPU cells examined with the inverted light microscope. The viability of the NPU cells was determined as ratio of live NPU cells to total number of NPU cells in blank control based on the colour difference. Finally, based on the determined percentage of viability of NPU cells in response to infection with *E. coli* strains all tested natural strains were classified into one of the following groups: Commensal group I (>75% viability), Low pathogenic group II (74% – 65% viability) and Highly pathogenic group III (64% – 0% viability).

To assess the cytokine production of the NPU cells in response to infection with *E. coli* strains, the amounts of cytokines released into the supernatant were determined with the commercially available Porcine ProcartaPlex™ Panel 1 kit for the simultaneous detection of nine different cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN- α , IFN- γ and TNF- α) (ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay USER GUIDE for Simplex Kits and Combinable Panel) [5]. In short, immediately after the 3h incubation period of the model with bacteria the cell culture supernatants were collected centrifuged and filtered in order to prepare bacteria-free samples. The detection assay was performed according to the manufacturer's protocol [5]. The samples were analysed using MagPix instrument (Lumiex, USA) for the simultaneous detection of multiple analytes. Based on the fold change in total cytokine production of infected NPU cells compared to the total cytokine production in the blank control sample the APEC strains were classified into one of the following groups: Low fold change group (from 1 to 1,99 fold change), Moderate fold change group (from 2 to 2,99 fold change) and High fold change group (3 fold change and more).

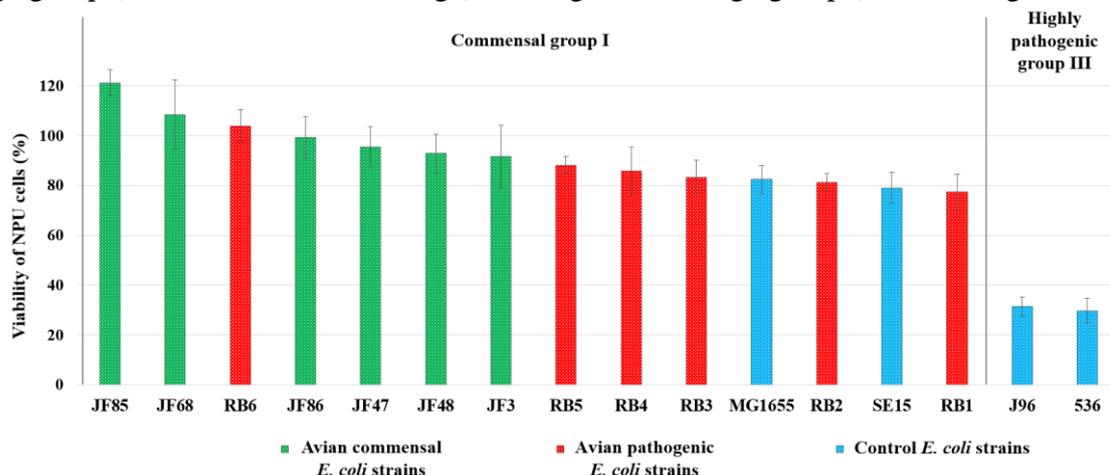


Figure 1: Viability values of NPU cells of the *in vitro* model infected with different *E. coli* strains: avian fecal (commensal) (JF designation, green columns), avian pathogenic (RB designation, red columns), and the set of control strains (blue columns). As control strains the non-pathogenic laboratory strain MG1655 and human fecal commensal strain SE15 (both used as negative control strains) and pathogenic human uropathogenic strains J96 and 536 (used as positive control strains). All results were normalized to the blank control, which was 100%. All the experiments were performed in at least four independent experiments, two for each biological sample and with three technical repetitions per experiment.

Results:

According to the obtained results of the drop in the viability of NPU cells after the infection of the *in vitro* biomimetic porcine urothelium model with studied avian *E. coli* strains, all tested *E. coli* strains (APEC and AFEC) were placed in the commensal group I. There were no studied avian *E. coli* strains classified as low pathogenic group II or highly pathogenic group III strains. The percentages of NPU cell viability obtained after the infection of the model are shown in Figure 1. As seen from Figure 1, even though all avian *E. coli* strains are in the commensal group I, 5 out of 6 APEC strains caused lower viability of NPU cells compared to AFEC strains. These results indicate that the APEC strains tested had low potential to cause infections in humans.

The analysis of the cytokine production of NPU cells in response to infection Fig. 2 revealed differences in the amount of individual cytokines secreted as well as in total amount of cytokines secreted. Different strains caused different cytokine production by infected NPU cells. Since some commensal strains (JF48, JF47 and JF86) caused much higher total cytokine production compared to some APEC strains (RB5, RB2) it is obvious that different strains have different strategies during infection and that pathogenic strains might have the ability to evade the immune response of the host's cells.

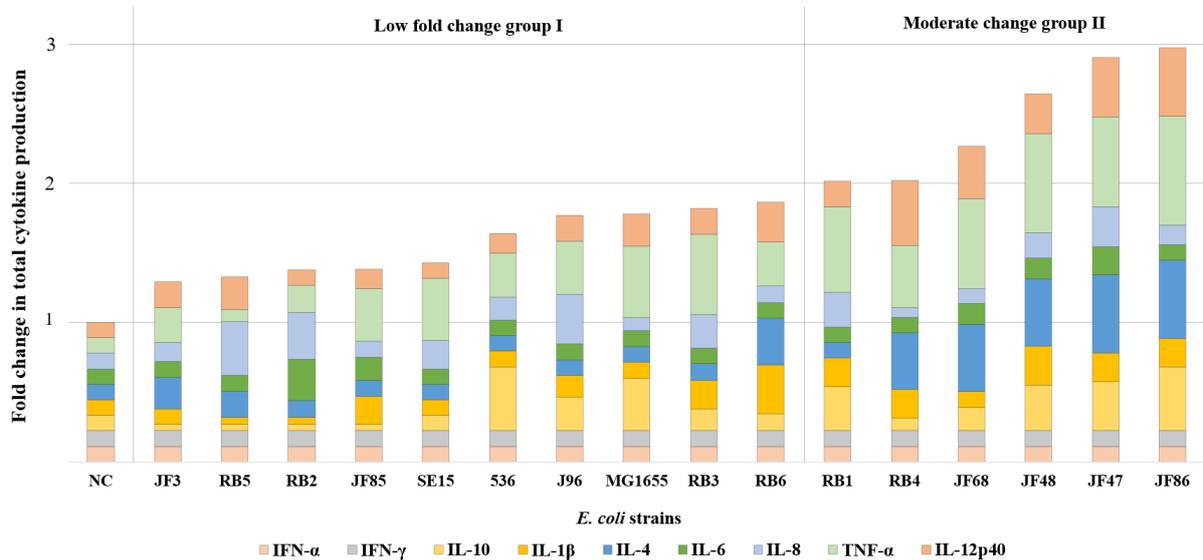


Figure 2: Fold change in total cytokine production of the NPU cells of the *in vitro* model in response to infection with different *E. coli* strains relative to the value of cytokine production in the blank control (NC) (NC – blank control – not infected NPU cells). Based on the results strains were grouped into two groups: Low fold change group I and Moderate fold change group II. No strain belonged into the High fold change group III. The fold change for each cytokine was calculated by dividing the average value from both duplicates in the *E. coli* infection assay with the average value of both duplicates in the blank control. All the data were collected in one experiment performed in duplicates.

Conclusions:

The results obtained on our *in vitro* model revealed a clear difference in the viability of NPU cells, when infected with different *E. coli* strains. The analysis of the cytokine response revealed that the NPU cells were able to respond to infection differently depending on the particular strain, which contributes to the efficiency of the model. Considering that NPU cells in cell culture retain their original morphological, molecular and ultrastructural characteristics and are genetically and physiologically similar to human urothelial cells, it can be assumed that the results obtained with this model could be relevant for human medicine and that the established model is a reliable model for assessing the potential zoonotic risk of APEC strains for humans.

Acknowledgments:

This work was partially supported by the Slovenian Research Agency (P1-0198, P3-0108) and partially supported by the Government of Perm Krai (C-26/792).

References

1. Mellata M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends // *Foodborne Pathog Dis.* –2013. –V. 10. –No 11.–P. 916-932.

2. Ibrahim R.A., Cryer T.L., Lafi S.Q., Basha E.A., Good L., Tarazi Y.H. Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors // *BMC Vet Res.* –2019. –V. 15. –No. 159.

3. LeStrange K., Markland S.M., Hoover D.G., Sharma M., Kniel K.E. An evaluation of the virulence and adherence properties of avian pathogenic *Escherichia coli* // *One Health.* –2017. –V. 4. –P. 22-26.

4. Predojević L., Keše D., Žgur Bertok D., Železnik Ramuta T., Veranič P., Kreft M.E., Starčič Erjavec M. Novel biomimetic porcine urothelial model for assessing *Escherichia coli* pathogenicity //...Manuscript in preparation.

5. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0016948_ProcartaPlex_Pig_Combinable_Simplex_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUHJvY2FydGFQbGV4IE11bHRpcGxleCBJbW11bm9hc3NheSBmb3IglU2lhcGxleCBLaXRzIGFuZCDBb21iaW5hYmxlIFBhbmVscyAtIFBpZyBBc3NheXM=

REMARKABLE PLASMIDS – THE STORY OF pRK100

Starčič Erjavec M.

Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

Keywords: iron up-take systems, antibiotic resistance genes, conjugation, replication regions, colicins

Introduction:

Plasmids are extrachromosomal, autonomously replicating DNA elements. They can be found in all three domains of the living world, in Archaea, Bacteria and Eukarya [1]. Plasmids may constitute a substantial amount of the total genetic content of an organism, representing more than 25% of the genetic material of the cell in some members of Archaea [2].

These extrachromosomal elements encode a remarkable array of phenotypic traits of medical, agricultural, environmental and commercial importance, for example resistances to antibiotics and heavy metals, virulence factors, supplementary metabolic pathways. Furthermore, some plasmids can transfer themselves and other parts of bacterial genome into different species, genera, or sometimes even families [1]. Besides playing a significant role in microbial adoption and evolution, they are also famous for their role in molecular biology studies and biotechnology [3].

Plasmids have a remarkable diversity. They range in size from a few hundred to hundreds of thousands of base pairs [4, 3]. Further, they differ by their mode of replication, the number of copies per host cell, the host range, the ability and way of transferring themselves horizontally and of course the repertoire of carried genes and transposable elements [1, 3]. A list of most famous plasmids with their characteristics is given in Table 1.

Table 1

Most famous plasmids and their characteristics [5].

Plasmid ^a	Size (bp)	Replication regions	Stable maintenance systems	Conjugal transfer regions	Virulence factors	Other properties
F (AP001918) <i>E. coli</i>	99,159	RepFIA(f) RepFIB(f) RepFIC	<i>flm</i> , <i>srn</i> , and <i>ccd</i> post-segregational killing systems; <i>sop</i> partitioning system; <i>psi</i> inhibition of SOS system	<i>tra</i>	none	<i>pif</i> for inhibition of T7 development
pO157 (AF074613) <i>E. coli</i>	92,077	RepFIIA(f) RepFIB(f) RepFIA	<i>flm</i> , and <i>ccd</i> post-segregational killing systems; <i>kfr</i> , and <i>klc</i> stable maintenance systems; <i>sop</i> partitioning system; <i>psi</i> inhibition of SOS system	<i>traI</i> , <i>traX</i> , <i>finO</i>	Ap ^r (Tn801); EHEC-haemolysin; O157:H7 toxin; <i>katP</i> catalase-peroxidase	<i>espP</i> extracellular serine protease; <i>etp</i> type II secretion pathway
pB171 (AB024946) <i>E. coli</i>	68,817	RepFIIA(f) RepFIB(f)	<i>ccd</i> post-segregational killing system; <i>stb</i> , and <i>vag</i> stable maintenance systems	none	<i>bfp</i> pili	<i>imp</i> UV protection; glutamate racemase amino acid antiporter
pWR501 (AF348706) <i>S. flexneri</i>	221,851	RepFIIA(f)	<i>ccd</i> post-segregational killing system; <i>par</i> partitioning system; <i>mvp</i> maintenance system; <i>psi</i> inhibition of SOS system	<i>traD</i> <i>traI</i> , <i>traX</i> , <i>finO</i>	<i>ipa-mxi-spa</i> pathogenicity island needed for invasion; <i>shet2</i> toxin; <i>mkaD</i> intracellular growth determinant	<i>rfuB</i> UDP-sugar hydrolase for O-antigen biosynthesis
R27 (AF250878) <i>S. typhi</i>	180,461	RepHIIA(f) RepHII B(f) RepFIA	<i>stm</i> post-segregational killing system; <i>par</i> partitioning system; <i>stb</i> stable maintenance system	<i>traI</i> <i>tra2</i>	Tc ^r (Tn10)	
R751 (U67194) broad host range	53,425	TrfA(f)	<i>inc</i> , and <i>kor</i> partitioning systems; <i>kle</i> , <i>klc</i> , and <i>kfr</i> stable maintenance systems	<i>tra</i> <i>trb</i>	polyketide antibiotic resistance (Tn4321)	
pYVe8081 (AF336309) <i>Y. enterocolitica</i>	67,720	IncL/M similar replication region(f)	<i>sop</i> , and <i>spy</i> partitioning systems	none	<i>yop</i> outer proteins, type III secretion system, V antigen	low-calcium response

^a For each plasmid the Genbank Accession number (in brackets) and its host are given.

^b The functional replication region is marked with (f).

^c Conjugal transfer regions of pO157 and pWR501 are incomplete. The conserved (partial) genes that are present are indicated.

Thirty years of research on pRK100:

The plasmid pRK100 was found in 1990 in the clinical *Escherichia coli* strain KS533, isolated from urine of a patient with urinary tract infection. In first experiments with this plasmid it was found that the plasmid is conjugative and encodes the aerobactin iron uptake system, ColV production and the drug resistance to ampicillin and tetracycline. The plasmid was estimated to be at least 85 kilobases in length [6].

Later it was found that the ampicillin and tetracycline resistance are carried together on the Tn5431 transposon, which arose by transposition of Tn3 (ampicillin resistance) into Tn1721 (tetracycline resistance) [7, 8]. Further research revealed that pRK100 plasmids encodes also the ColIa production, has two replicons, the RepFIB and RepFIC, can also integrate into the chromosome and encodes also ColIa production. A restriction map of pRK100 was constructed on the basis of hybridization experiments and partial nucleotide sequencing and the pRK100 length was enlarged to 145 kbp (Fig. 1A). Moreover, serum survival was tested for the original clinical strain KS533 and a strain C600 and C600 harbouring pRK100 in the presence of 1%, 2% and 3 % human serum. The results showed increased survival of C600 harbouring pRK100 in the presence of 1 % and 2 % serum (five- and fourfold, respectively) while both strains were killed in the presence of 3% serum. In contrast, both the clinical strain KS533 with plasmid pRK100 and strain KS533 without the plasmid exhibited growth at all serum concentrations tested. Stability assays (passages of pRK100 harbouring cells without antibiotic selection at 37 °C and 42 °C, introduction of an incompatible plasmid, growth of the pRK100 host in LB supplemented with acridine orange or SDS) revealed that pRK100 is a very stable plasmid. To define the plasmid host range conjugation assays (plate mating and liquid mating) with *E. coli*, *Staphylococcus typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* were performed and the obtain results demonstrated that pRK100 is a narrow host range plasmid. The conjugation frequency into an *E. coli* strain was 2.4×10^{-2} , while it was only 1.2×10^{-6} into *K. pneumoniae*. pRK100 transfer into all other tested recipient bacteria was never detected [9].

Subsequently, the pRK100 replication regions were more investigated. Via ligation of Tn1725 with plasmid restriction fragments and targeted cloning of putative replication regions minireplicons were constructed. Sequence analysis of the constructed minireplicons indicated two functional replication regions, an F plasmid related RepFIB and a R1 plasmid related RepFIIA replication region [10, 11]. Partial nucleotide sequencing of other regions of the plasmid revealed genes that encode a further iron up-take system, the putative enterochelin iron uptake system previously associated with an *E. coli* pathogenicity island, PAI III536. In addition, a homologue of the R100 plasmid related *rmoA* gene was found that exhibited strong similarity to *hha/ymoA* encoding the Hha/YmoA class of modulators of gene expression. PCR and hybridization experiments further demonstrated that pRK100 harbours multiple IS2 and IS3 insertion sequences that may have facilitated in the acquisition of elements from other DNA molecules. These data together with the previous identification of a F-like *tra* region and a pColIa-like colicin Ia, indicated that pRK100 has a highly mosaic structure with elements derived from many different known large natural plasmids (Fig. 1B) [10].

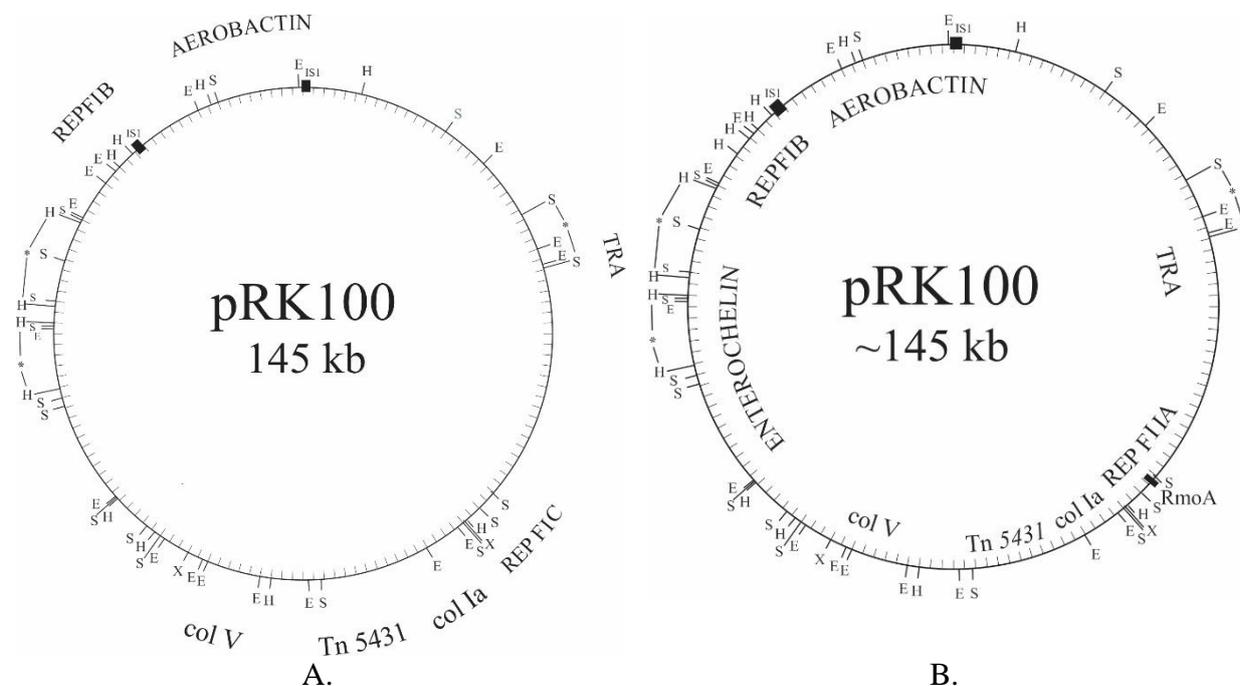


Figure 3: Map of pRK100 in the year 1998 (A) and in the year 2003 (B).

The *tra* region and regulation of the pRK100 conjugal transfer were also looked into more details. It was discovered that the pRK100 *tra* region is the most similar to the *tra* region of the well-known plasmid F [12]. Extensive molecular biology researched showed that cAMP-CRP complex, Lrp and H-NS are positive regulators of pRK100 conjugal transfer [13, 14]. As recently it became evident that different *E. coli* strains can be differently “good” recipients in plasmid conjugal transfer (Kuznetsova et al. unpublished results), conjugation experiments with pRK100 into four different natural uropathogenic *E. coli* strains were performed. Indeed obtained conjugation frequencies varied among strains. [15].

Recent advances in technology enabled next generation sequencing. The complete nucleotide sequence of pRK100 was hence finally resolved - based on Illumina and PacBio and some Sanger sequencing. Obtained nucleotide sequences were joined into one complete pRK100 nucleotide sequence using Unicycler and the obtained sequence was annotated using Prokka and Blast [15].

Conclusions: David Summers, a well-known researcher in the field of plasmid biology once said: “Like many bacteria before me I found that once picked up, plasmids were hard to put down.” I have to admit that I do share this experience and that the pRK100 plasmid has been since I started to do the lab work for my Graduation Thesis influencing my research and shaping my scientific world.

Acknowledgments:

This work was supported by the Slovenian Research Agency (P1-0198). In the pRK100 studies many co-workers were involved: M. Grabnar, D. Žgur-Bertok, E. Modrič, J. Ambrožič Avguštin, A. Ostroveršnik, I. Kuhar, Z. Podlesek, W. Gaastra, J.P. van Putten, B. Jordi, M. Wösten, T. Sysoeva, K. Jeseničnik, A. Kastrin, L. Elam, T. Johnson and L. Predojevič.

References

1. Funnell B.E., Phillips G.J. (editors) Plasmid Biology // ASM Press, Washington, D.C. 2004.
2. Zillig W., Arnold H.P., Holz I., Prangishvili D., Schweier A., Stedman K., She Q., Phan H., Garrett R., Kristjansson J.K. Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* // Extremophiles.–1998. –V. 2. –P.131-140.
3. Snyder L., Peters J.E., Henkin T.M., Champness W. Molecular Genetics of Bacteria (4th Edition) // ASM Press, Washington, D.C. 2013.

4. Kado C.I. Origin and evolution of plasmids // Antoine van Leeuwenhoek. –V. 73. –P. 117-126.
5. Starčič Erjavec M. Mosaic Structure and Regulation of Conjugal Transfer of the *Escherichia coli* Plasmid pRK100. PhD Thesis //Utrecht University, –2003.
6. Žgur-Bertok D., Modrič E., Grabnar M. Aerobactin uptake system, ColV production, and drug resistance encoded by a plasmid from an urinary tract infection *Escherichia coli* strain of human origin // Can J Microbiol. –1990. –V. 36. –No. 4. –P. 297-299.
7. Žgur-Bertok D., Ambrožič J., Podlesek Z., Grabnar M. Tn5431, a new transposable element composed of TnI721- and Tn3-like genes // Plasmid. –1994. –V. 32 –No. 1. –P. 95-99.
8. Žgur-Bertok D., Ambrožič J., Grabnar M. Tn5431 arose by transposition of Tn3 into TnI721 //Can J Microbiol. –1996. –V. 42. –No. 12. –P.1274-1276.
9. Ambrožič J., Ostroveršnik A., Starčič M., Kuhar I., Grabnar M., Žgur-Bertok D. *Escherichia coli* ColV plasmid pRK100 : genetic organization, stability and conjugal transfer // Microbiology. –1998. –V. 144. –P. 343-352.
10. Starčič Erjavec M., Gaastra W., van Putten J., Žgur-Bertok D. Identification of the origin of replications and partial characterization of plasmid pRK100 // Plasmid. –2003. –V. 50. –No. 2 –P. 102-112.
11. Starčič Erjavec M., Žgur-Bertok D. The RepFIIA replicon of the natural *Escherichia coli* plasmid pRK100 // Acta Biologica Slovenica. –2006. –V. 49. –No. 2. –P. 3-12.
12. Starčič Erjavec M., Gaastra W., Žgur-Bertok D. *tra* region of the natural *Escherichia coli* plasmid pRK100 is F-like // Acta Biologica Slovenica. –2002. –V. 45. –No. 1. –P. 9-15.
13. Starčič M., Žgur-Bertok D., Jordi B.J., Wösten M.M., Gaastra W., van Putten J.P. The cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein complex regulates activity of the *traJ* promoter of the *Escherichia coli* conjugative plasmid pRK100 // J Bacteriol. –2003. –V. 185. –No. 5. –P. 1616-1623.
14. Starčič Erjavec M., van Putten J.P., Gaastra W., Jordi B.J., Grabnar M., Žgur-Bertok D. H-NS and Lrp serve as positive modulators of *traJ* expression from the *Escherichia coli* plasmid pRK100 // Mol Genet Genomics. –2003. –V. 270. –No. 1. –P. 94-102.
15. Sysoeva T., Jeseničnik K., Kastrin A., Elam L., Johnson T., Predojević L., Starčič Erjavec M. Plasmid pRK100: sequencing, assembly and analysis of the complete nucleotide sequence and partial phenotypic characterization // Manuscript in preparation.

ВИТАЛИТЕТНАЯ СТРУКТУРА ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ *HELICHRYSUM ARENARIUM* (L.) МОЕНСН В УСЛОВИЯХ ПРЕДГОРНОЙ ЛЕСОСТЕПНОЙ ЗОНЫ КРЫМА

Абдуллина Р.Х., Прохоренко Н.Б., Тимофеева О.А.
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия

Ключевые слова: ценопопуляция, виталитетная структура, индекс I_Q , критерий Q .

В данной работе представлены результаты исследования виталитетной структуры ценопопуляций (ЦП) *Helichrysum arenarium* на территории предгорной лесостепной зоны Крыма. Цель исследования – оценка морфологического статуса растений и структуры ценопопуляций цмина песчаного из разных эколого-центотических условий. Были поставлены следующие задачи:

1. Определить морфометрические показатели вегетативных и генеративных органов *Helichrysum arenarium*;

2. Определить долю особей разных классов виталитета;
3. Рассчитать индекс виталитета ценопопуляции; определить виталитетный тип ЦП.

Исследовали зависимость типа виталитета ЦП *Helichrysum arenarium* от эколого-ценотических условий местообитания. Для исследования были отобраны от 16 до 30 средневозрастных генеративных особей (g_2) из трех ценопопуляций. Сбор растений проводился в фазу массового цветения в 2018 году. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 10.

Природные популяции лекарственных растений остаются резервным источником пополнения запасов лекарственного сырья для фармацевтической промышленности. Популяции редких лекарственных растений нуждаются в охране. Для оценки состояния популяции используют метод выявления виталитетной структуры, которая отражает количественное соотношение растений разной жизненности.

Цмин песчаный – многолетнее травянистое лекарственное растение из семейства сложноцветных. В соцветиях содержится различные флавоноиды, а препараты из них применяются как желчегонные средства при заболеваниях печени. Встречается в лесостепной и на юге лесной зон европейской части России, в степных районах Западной Сибири [1]. Евро-азиатский вид лесной и степной зон [2]. Вид включен в региональные Красные книги Чувашии, Марий Эл, Кировской области, Башкортостана, Ульяновской области и Республики Татарстан. Лимитирующим фактором, приводящий к сокращению численности популяции, выступает уменьшение площадей сосновых насаждений, пожары, а также выпас скота [3].

В предгорной лесостепной зоне Крыма нами были исследованы три ценопопуляции *Helichrysum arenarium*, которые отличаются положением над уровнем моря и степенью увлажнения атмосферными осадками. ЦП №1 и ЦП №2 расположены на территории памятника природы регионального значения «Бакла»: ЦП №1 – 290м над ур.м., ЦП №2 на высоте 472м над ур.м. (среднее количество осадков 500-600 мм/год). ЦП №3 исследовалась в окрестностях г. Симферополь, на высоте 330м на ур.м. (среднее количество осадков 450-500 мм). По данным И. Я. Половицкого с соавт. (1987) почвы в окрестностях г. Симферополь дерново-карбонатные, на территории «Бакла» – буроземы горные [4]. Сбор растений для морфологического анализа проводился в 2018 году в фазу массового цветения. Для исследования были отобраны средневозрастные генеративные особи (g_2).

Виталитетная структура популяций исследовалась по показателю высоты растения (Н) по методике Ю.А. Злобина (1989) [5]. На основе количественного соотношения растений высшего (а), среднего (b) и низшего (с) классов виталитета рассчитывали значения критерия Q и определяли тип виталитетной структуры ЦП: $Q=1/2(a+b) > c$ – процветающие; $Q=1/2(a+b) = c$ – равновесные; $Q=1/2(a+b) < c$ – депрессивные. Значение I_Q рассчитывали по формуле $I_Q=(a+b)/2c$ [6].

Морфологический анализ показал, что высота растения *H. arenarium* находится в пределах от 6 см до 49 см и в среднем составляет 25,8см. При этом в ЦП №3 в 3,3 раза ниже по сравнению с особями из ЦП №1 (таблица 1).

Значение общей сухой фитомассы растения также больше у растений в ЦП №1 и в среднем составляет 1,53г., что в 1,7-2,4 раза выше по сравнению с ЦП 2 и 3 соответственно. Минимальное значение фитомассы (0,16 г) набирают растения в ЦП №2. Фитомасса репродуктивных органов в ЦП №1 в 3,1 раза больше, чем в остальных ЦП и составляет 0,44 г. При этом среднее значение количества цветков в соцветии примерно одинаковое (ЦП №1 - 35,5 шт., ЦП №2 – 40,33 шт., ЦП №3 – 36,07 шт.), что указывает на высокую стабильность данного параметра репродуктивной сферы.

Таблица 1

Морфометрические особенности растений *Helichrysum arenarium*

№	Параметры	ЦП №1			ЦП №2			ЦП №3		
		$\bar{x} \pm Sx$ min – max	σ	Cv	$\bar{x} \pm Sx$ min – max	σ	Cv	$\bar{x} \pm Sx$ min – max	σ	Cv
1	Высота растения Н, см	$46 \pm 0,48$ 43 – 49	1,93	4,20	$18,27 \pm 0,69$ 12 – 25	3,80	20,80	$13,96 \pm 0,63$ 6,3 – 20	3,49	24,98
2	Общая фитомасса растения, W, г	$1,64 \pm 0,10$ 1,00 – 2,13	0,40	24,65	$0,88 \pm 0,08$ 0,16 – 2,39	0,45	50,42	$0,62 \pm 0,05$ 0,19 – 1,15	0,28	44,96
3	Фитомасса репродуктивных органов, WG, г	$0,45 \pm 0,001$ 0,25 – 0,61	0,14	30,47	$0,14 \pm 0,07$ 0,06 – 0,34	0,07	49,27	$0,14 \pm 0,02$ 0,04 – 0,35	0,08	58,52
4	Число цветков в соцветии Nfl, шт	$34,88 \pm 1,28$ 28 – 43	5,15	14,77	$40,33 \pm 1,55$ 6 – 51	8,48	21,03	$36,07 \pm 1,39$ 21 – 48	7,60	21,08

Согласно распределения особей между классами виталитета по параметру высота растений было определено, что в ЦП №1 у подножья горы Бакла и в окрестностях г. Симферополь преобладали особи высшего класса виталитета (а) (Таблица 2).

Таблица 2

Характеристика виталитетного типа ЦП *Helichrysum arenarium*

Ценопопуляции	Доля особей по классам виталитета, %			Q	I _Q	Виталитетный тип ЦП
	a	b	c			
ЦП №1	50	25	25	37	1,5	процветающая
ЦП №2	33,33	33,33	33,33	33	1	равновесная
ЦП №3	43,33	20	36,66	36	0,86	депрессивная

В ЦП №2 особи высшего (а), среднего (b) и низшего (c) класса виталитета были в равном соотношении. По результатам индексов Q и I_Q тип виталитетной структуры ЦП №1 – процветающая, в ЦП №2 – равновесная, в ЦП №3 – депрессивная. Следовательно, процветающий тип ценопопуляции формируется на сравнительно низких элементах рельефа в условиях повышенного увлажнения атмосферными осадками.

Таким образом, высота и виталитетная структура растений в ЦП *Helichrysum arenarium* зависят от высоты над уровнем моря и количество осадков. Наиболее оптимальные условия произрастания в ценопопуляции у подножья памятника природы регионального значения «Бакла» на высоте 290м над уровнем моря и со средним количеством осадков 500-600 мм/год. Низкое же количество осадков в центральной части полуострова Крым (в окрестностях г. Симферополь) приводит к формированию популяций цмина песчаного депрессивного типа.

Выводы: исследования показали, что состав и структура ЦП *Helichrysum arenarium* изменяется в зависимости от высоты над уровнем моря и количества атмосферных осадков.

Библиографический список

1. Яковлев Г. П., Белодубровская Г. А. и др. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. Фармакогнозия: учебное пособие / под ред. Г. П. Яковлева. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 808 с.
2. Цвелев Н.Н. Род Цмин – *Helichrysum* Mill.//Флора Европейской части СССР.Т.7. – СПб. 1994. – С.94-97.
3. Красная книга Республики Татарстан (животные, растения, грибы). Издание второе. – Казань: Идел-Пресс, 2006. – 832 с.

4. Половицкий И.Я., Гусев П.Г. Почвы Крыма и пути повышения их плодородия – Симферополь: "Таврия", 1987. – 152 с.

5. Злобин Ю.А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений: учеб.-метод. пособие / Ю.А. Злобин. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1989. – 146 с.

6. Методы изучения ценопопуляций цветковых растений: учеб.-метод. пособие для магистров биологического факультета / сост.: А.С. Кашин, Т.А. Крицкая, Н.А. Петрова, И.В. Шилова. Саратов, 2015. – 127 с.

СЕНСОРНЫЕ ПОЛЯ НА АНТЕННАХ РУЧЕЙНИКОВ СЕМЕЙСТВА HYDROPSYCHIDAE (TRICHOPTERA: ANNULIPALPIA)

Абу Дийак К. Т.

Кафедра энтомологии Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург, Россия

Ключевые слова: сенсиллы, Hydropsychidae, Trichoptera

Введение

Hydropsychidae – крупное семейство кольчатощупиковых ручейников (Annulipalpia), в состав которого входит 5 подсемейств (Arctopsychinae Martynov, 1924; Diplectroninae Ulmer, 1951; Smicrideinae Flint, 1974; Hydropsychinae Curtis, 1835; Macronematinae Ulmer, 1905) [1] и более 1700 описанных видов. Сенсиллы ручейников отвечают за восприятие ольфакторных стимулов и необходимы для феромонной коммуникации у этих насекомых [2]. Сенсорные поля Trichoptera представляют собой более или менее компактные группы изогнутых трихонидных сенсилл, которые расположены на определенной области сегмента [3]. Поверхность антенн и сенсорные поля подробно изучены у двух семейств подотряда Annulipalpia – Philopotamidae [4] и Ecnomidae [5]. По представителям семейства Hydropsychidae имеется небольшое количество данных: изучены два вида из подсемейства Hydropsychinae – *Hydropsyche newae* и *Hydropsyche contubernalis* [2,6]. Целью данного исследования является оценка формы сенсорных полей и количества сенсилл в них у представителей всех пяти подсемейств семейства Hydropsychidae.

Материал и методика

Форма сенсорных полей была исследована у самцов 10 видов семейства Hydropsychidae: *Arctopsyche palpata* Martynov, 1934 (Arctopsychinae); *Hydropsyche newae* Kolenati, 1858; *Hydropsyche orientalis* Martynov, 1934; *Hydropsyche pellucidula* Curtis, 1834; *Hydronema persica* Martynov, 1914 (Hydropsychinae); *Diplectrona gombak* Olah, 1993 (Diplectroninae); *Smicridea murina* McLachlan, 1871 (Smicrideinae); *Amphipsyche gratiosa* Navas, 1922; *Macrostemum fenestratum* Albarda, 1881; *Macrostemum radiatum* McLachlan, 1872 (Macronematinae).

Исследование было проведено с использованием сканирующей электронной микроскопии. Антенны ручейников, хранившихся в 96% спирте, были помещены на столики для электронной микроскопии вентральной стороной вверх для получения изображений сенсорных полей. После этого образцы были покрыты 20 нм золотом при помощи напылительной установки Leica EM SCD500. Изображения поверхности сегментов антенн были получены с помощью сканирующих электронных микроскопов JEOL NeoScore JCM-5000 и Tescan MIRA3 при увеличении 400 – 3700. Для подсчета количества сенсилл использовалась программа ImageJ 1.52a, средние значения и ошибки среднего были подсчитаны в MS Excel 2007.

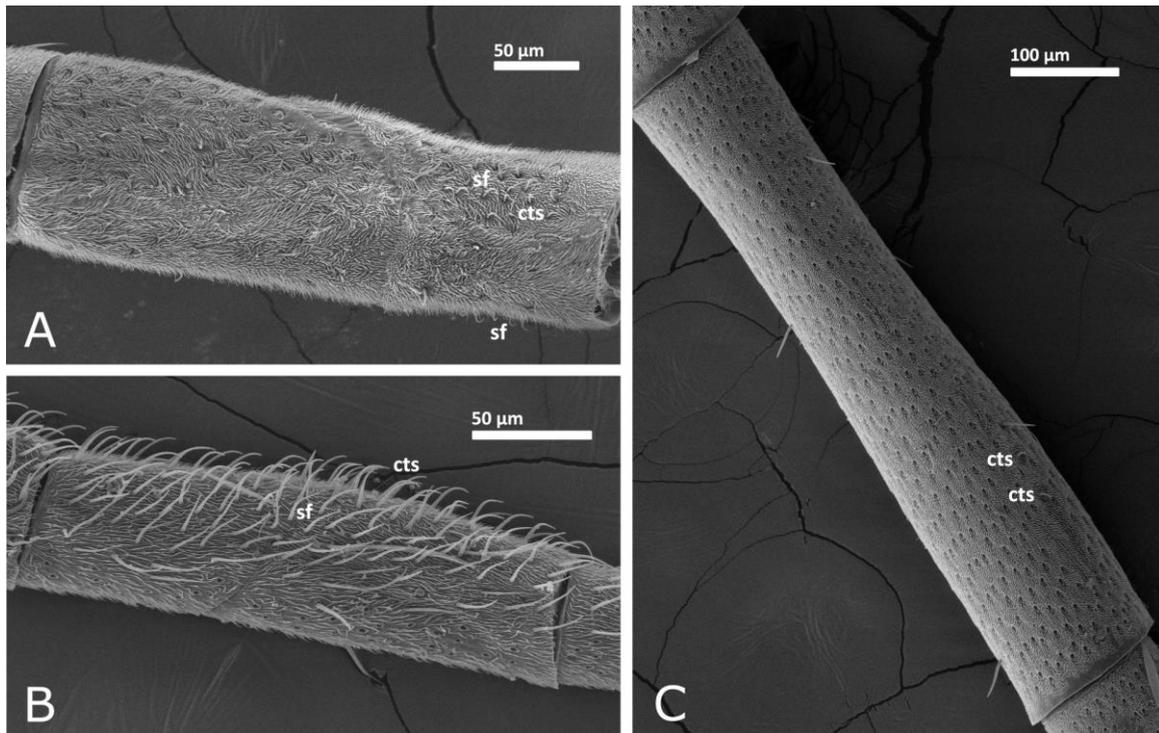


Рис. 1. Базальные сегменты антенн ручейников семейства Hydropsychidae. (A) *Hydronema persica*, (B) *Diplectrona gombak*, (C) *Macrostemum radiatum*. Обозначения: sf – сенсорные поля; cts – изогнутые трихоидные сенсиллы.

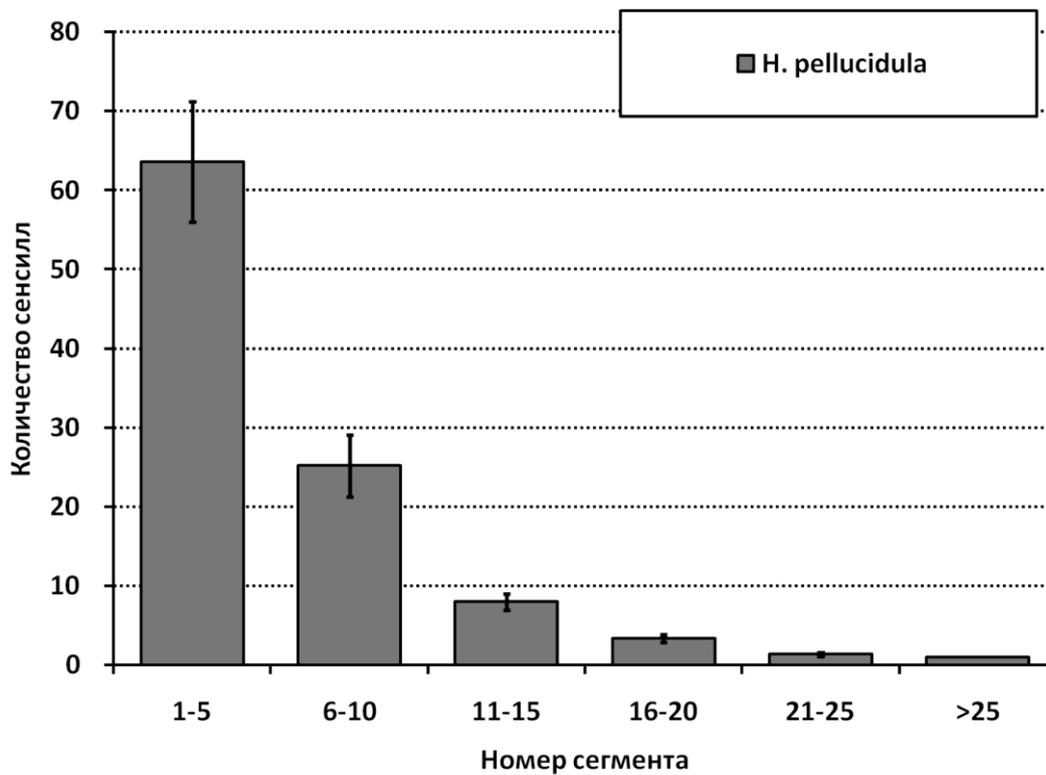


Рис. 2. Количественное распределение изогнутых трихоидных сенсилл у *Hydropsyche pellucidula* (Hydropsychinae).

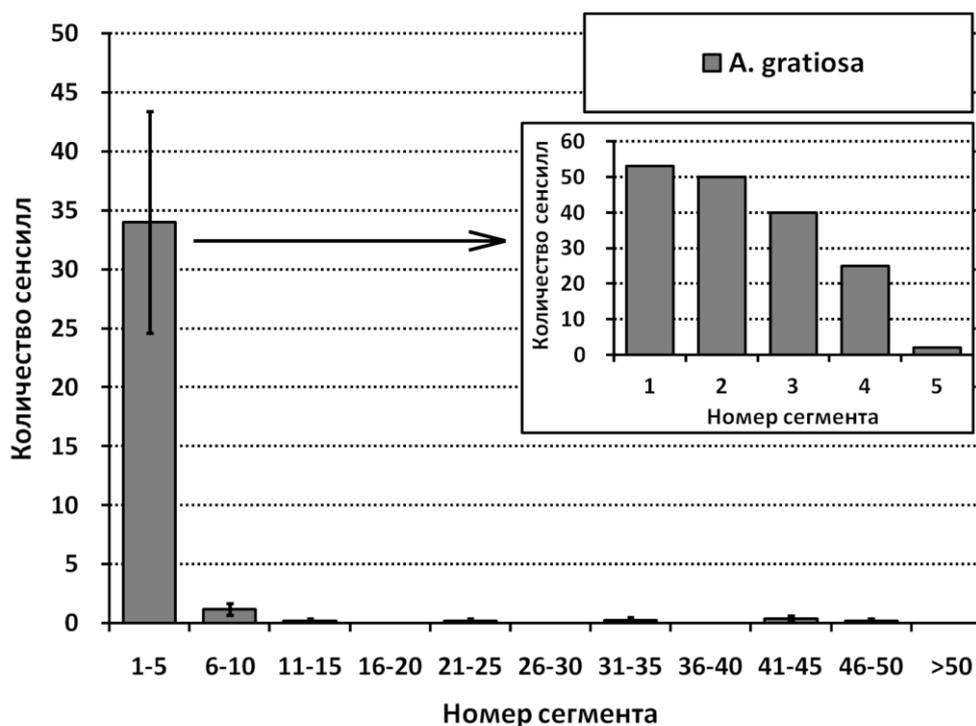


Рис. 3. Количественное распределение изогнутых трихоидных сенсилл у *Amphipsyche gratiosa* (Macronematinae).

Результаты и обсуждение

Сенсорные поля всегда находятся на вентральной или вентролатеральной стороне сегмента антенны, но их форма переменна в пределах изученного семейства. У представителей подсемейств Arctopsychinae и Hydropsychinae сенсорные поля обычно расположены на дистальной части сегмента и состоят из двух симметричных частей (рис. 1, А), либо имеют U-образную форму. Для подсемейств Diplectroninae, Smicrideinae и Macronematinae типичны сенсорные поля, занимающие всю вентролатеральную сторону сегмента (рис. 1, В).

При этом, у большинства Macronematinae происходит редукция сенсорных полей: они есть не более чем на первых пяти сегментах и исчезают уже на базальной части антенны (рис. 1, С). У представителей других подсемейств сенсорные поля сохраняются как минимум до середины антенны.

Количество изогнутых трихоидных сенсилл в сенсорных полях уменьшается к дистальной части антенны у всех исследованных представителей семейства Hydropsychidae. Для Arctopsychinae, Hydropsychinae, Diplectroninae и Smicrideinae характерно постепенное снижение количества сенсилл в сенсорных полях (рис. 2). У представителей подсемейства Macronematinae, наоборот, происходит резкое падение количества изогнутых трихоидных сенсилл уже на базальных сегментах (рис. 3). Похожий случай редукции сенсорных полей был отмечен у *Nectopsyche albida* (Leptoceridae): на проксимальных сегментах количество изогнутых трихоидных сенсилл велико, а сегменты средней и дистальной части антенны несут одиночные сенсиллы этого типа [7]. Среднее количество изогнутых трихоидных сенсилл на сегмент у Diplectroninae велико по сравнению с другими подсемействами и может достигать двух сотен.

Сенсорные поля на сегментах антенн были найдены во всех подсемействах Hydropsychidae и у всех изученных видов. В пределах семейства они имеют различную форму, но всегда достигают наибольшего развития в базальной части антенны. Редукция

сенсорных полей у *Macronematinae*, а также увеличение количества сенсилл в них у *Dipletroninae* может быть связано с модификациями феромонной коммуникации. *Macronematinae* и *Leptoceridae* [7], у которых наблюдается сходная редукция сенсорных полей, могут иметь похожий способ коммуникации.

Благодарности

Автор выражает благодарность В. Д. Иванову, С. И. Мельницкому, Н. Ю. Ключе и И. А. Махову за предоставленный материал, а также М. Ю. Валуйскому и В. Д. Иванову за обсуждение результатов.

Исследование выполнено в рамках проекта Ресурсного центра СПбГУ № 109-16530.

Библиографический список

1. Morse, J.C. (ed.) Trichoptera World Checklist. – 2020 [Электронный ресурс]. URL: <http://entweb.clemson.edu/database/trichopt/index.htm> (дата обращения: 20.09.2020).
2. Melnitsky S. I., Ivanov V. D. Structure and localization of sensilla on antennae of caddisflies (Insecta: Trichoptera) // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2011. – Т. 47. – №. 6. – С. 593-602.
3. Valuyskiy M. Y., Melnitsky S. I., Ivanov V. D. Structure of antennal sensilla in the caddisfly genus *Rhyacophila pictet* (Trichoptera, Rhyacophilidae) // *Entomological Review*. – 2017. – Т. 97. – №. 6. – С. 703-722.
4. Melnitsky S. I. et al. Comparison of sensory structures on the antenna of different species of *Philopotamidae* (Insecta: Trichoptera) // *Arthropod structure & development*. – 2018. – Т. 47. – №. 1. – С. 45-55.
5. Valuyskiy M. Y., Melnitsky S. I., Ivanov V. D. Comparative Analysis of Antennal Surfaces in Adult Caddisflies of the Genus *Ecnomus* McLachlan (Trichoptera, Ecnomidae) // *Entomological Review*. – 2019. – Т. 99. – №. 3. – С. 302-309.
6. Ivanov V. D., Melnitsky S. I. Diversity of the olfactory sensilla in caddisflies (Trichoptera) // *Zoosymposia*. – 2016. – Т. 10. – №. 1. – С. 224-233.
7. Tozer W. External antennal morphology of the adult and larva of *Nectopsyche albida* (Walker) (Trichoptera: Leptoceridae) // *Freshwater Invertebrate Biology*. – 1982. – Т. 1. – №. 1. – С. 35-43.

К ИЗУЧЕНИЮ СПЕКТРА ПИТАНИЯ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ В ЛЕСОСТЕПНОМ ЗАУРАЛЬЕ

Акинфиева А.А.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г.Пермь, Россия

Ключевые слова: спектр питания, лягушки, пауки, лесостепь, Зауралье

Амфибии, такие как остромордая лягушка, имеют широкий спектр потребляемых живых существ. Анализ литературных данных показал, что наблюдаются региональные особенности спектра питания лягушек. Так в Самарской области лягушки в основном питались представителями 3 отрядов: полужесткокрылые, жесткокрылые и перепончатокрылые [4, 5]. Тогда как в Мордовии основу пищевого комка лягушек составляют представители отряда жесткокрылых, личинки чешуекрылых, и некоторые виды моллюсков [1, 9-11]. В других случаях отмечается важная роль других таксономических групп, например, двукрылых, полужесткокрылых, муравьев [1, 3]. Паукообразные в спектрах питания лягушек редко являются обильными [1, 3], чаще, их

доля не значительна [2,6,8]. Работ, посвященных исследованию питания лягушек в условиях лесостепного Зауралья, найти не удалось.

Целью нашего исследования явилось изучение спектра питания лягушек в условиях лесостепного Зауралья.

Сбор материала производился на особо охраняемой природной территории Троицкий заказник в Челябинской области в июне-июле 2018 года. Лягушки отлавливались с помощью почвенных ловушек с соленой водой в качестве фиксатора. Ловушки проверялись ежедневно. Изъятые желудки со всем содержимым помещались в 70% спирт. Анализ содержимого желудков лягушек проводился в лабораторных условиях, с использованием бинокулярного микроскопа. Всего обследовано содержимое 24 желудков; 8 из них не содержали пищевого комка. В Троицком заказнике два вида семейства: остромордая *Rana terrestris* и травяная лягушки *R. temporaria* [13]. Первый вид имеет высокую численность и широко распространен по всей территории заказника, второй – редок [13]. Определение лягушек не проводилось. Предполагается, что обследованные животные относятся к наиболее распространенному в данной области виду остромордая лягушка.

В питании остромордой лягушки обнаружены представители 6 отрядов членистоногих животных: Araneae, Coleoptera, Heteroptera, Diptera, Hymenoptera, Collembola.

Основу пищевого комка составляли двукрылые насекомые, среди которых наиболее многочисленны комары, составляющие в среднем четвертую часть особей всех беспозвоночных, обнаруженных в желудках (табл. 1). Жесткокрылые насекомые и пауки имеют одинаковое обилие (1.4 экз./желудок), составляя по 14% пищевого комка, каждый.

До видового уровня удалось определить пауков. Из данных таблицы 2 видно, что чаще всего в пищевом комке присутствуют пауки-волки (Lycosidae) и пауки-пигмеи (Linyphiidae), доля которых – 18.2%. Со средним значением обилия 0.19 экз./желудок представлены пауки-кругопряды (Araneidae). Представители других семейств единично представлены в пищевых комках остромордой лягушки.

Таблица 1

Среднее обилие (экз./желудок) и доля (%) таксонов в питании остромордой лягушки в Троицком заказнике

Группа беспозвоночных	Среднее обилие	Доля
Комары	2.4 ± 3.0	25,0
Пауки	1.4 ± 1.1	14,1
Жесткокрылые	1.4 ± 1.5	14,1
Цикадки	1.0 ± 1.2	10,9
Перепончатокрылые	1.0 ± 1.5	9,6
Мухи	0.8 ± 2.0	7,7
Клопы	0.5 ± 0.6	5,1
Коллемболы	0.4 ± 1.0	3,8
Прочие остатки	1.0 ± 1.2	9,7
Всего	9.9	99.9

Полученные нами данные по питанию остромордой лягушки существенно отличаются от литературных данных по спектрам питания лягушек разных видов в европейской части России. Одна из существенных особенностей - большое количество пауков в рационе остромордой лягушки на территории Троицкого заказника в Челябинской области.

Среднее обилие (экз./желудок) и доля (%) таксонов пауков в питании остромордой лягушки

Таксон	Среднее обилие	Доля
Araneidae		
<i>Araneus</i> ssp.	0.19	13.6
Gnaphosidae		
<i>Haplodrassus moderatus</i>	0.06	4.5
<i>Zelotes latreillei</i>	0.06	4.5
Linyphiidae	0.25	18.2
Lycosidae		
<i>Alopecosa aculeata</i> (lycosidae)	0.06	4.5
<i>Pardosa fulvipes</i>	0.25	18.2
Неполовозрелые особи	0.06	4.5
Philodromidae	0.06	4.5
<i>Tibellus</i> ssp.		
Salticidae	0.06	4.5
<i>Evarcha</i> ssp.		
<i>Sibianor larae</i>	0.06	4.5
Mimetidae		
<i>Ero</i> ssp.	0.06	4.5
Theridiidae		
<i>Asagena phalerata</i>	0.06	4.5
Всего	1.23	90.5

Библиографический список

1. Аслямова А.И., Ибрагимова Д.В. Видовая дифференциация питания земноводных (Amphibia, Vertebrata) Дюртюлинского района (республики Башкортостан) // Наука и инновации XXI века: Материалы IV Всероссийской конференции молодых ученых. Сургут, 2017. С. 130-133.

2. Белоусова И.Н. Питание лягушек *Rana ridibunda* // Теория и практика современных гуманитарных и естественных наук: Материалы ежегодной межрегиональной научно-практической конференции. Камчатский край, 2012. С. 174-176.

3. Зарипова Ф.Ф., Файзулин А.И., Кузовенко А.Е. Особенности питания озерной лягушки в условиях техногенного загрязнения тяжелыми металлами (республика Башкортостан) // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2013. Т. 18, № 4. С. 1279-1282.

4. Колодина А.С., Пятова М.В., Равковская Е.А., Лада Г.А. К вопросу о питании и гельминтах прудовой лягушки (*Pelophylax lessonae*) в условиях Тамбовской области // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2016. Т. 21, № 5. С. 1791-1796.

5. Кузовенко А.Е., Файзулин А.И. О питании зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) в популяционной системе REL-типа в Самарской области // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2013. Т. 18, № 6. С. 3022-3025.

6. Кулакова Е.Ю., Лада Г.А., Резванцева М.В. Таксономический состав пищевых компонентов в рационе зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) Хоперского государственного заповедника (Новохоперский район Воронежской области) // Вестник

Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2009. Т. 14, № 3. С. 549-554.

7. Лада Г.А., Пятова М.В., Равковская Е.А., Кислинская А.А., Путинцева А.А. Новые сведения о питании и гельминтофауне озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) на востоке центрального Черноземья // Биоразнообразие и антропогенная трансформация природных экосистем: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти А.И. Золотухина и Году экологии. Тамбов, 2017. С. 109-117.

8. Лукиянов С.В., Ручин А.Б., Рыжов М.К. Спектр и динамика питания *Rana arvalis* Nilsson в условиях Мордовии // Бюллетень Самарская Лука. 2006. № 17. С. 101-107.

9. Ручин А.Б. Материалы по изучению спектров питания травяной лягушки (*Rana temporaria*) в пойменных лугах // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2013. № 1. С. 23-27.

10. Ручин А.Б. Спектр питания травяной лягушки (*Rana temporaria*) в Мордовии // Мир науки, культуры, образования. 2014. № 1(44). С. 387-391.

11. Ручин А.Б. Экология земноводных и пресмыкающихся Мордовии. Сообщение 2. Травяная лягушка, *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 // Труды Мордовского государственного природного заповедника им. П.Г. Смидовича. 2015. № 14. С. 344-358.

12. Ручин А.Б., Алексеев С.К. К изучению спектров питания трех совместно обитающих видов амфибий в сосняке (Калужская область) // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. 2012. № 29. С. 261-264.

13. Чашин С.П. Животный мир Троицкого заказника (Наземные позвоночные). Пермь, 1982. 36 с.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОМИЦЕТОВ РОДА *FUSARIUM* - ВОЗБУДИТЕЛЕЙ УВЯДАНИЯ И СУХОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ

Акосах Й.А., Марданова А.М.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра микробиологии, г. Казань, Россия

Ключевые слова: *Fusarium* spp., сухая гниль, увядание, *Solanum tuberosum* L.

Повышенное инфицирование фитопатогенными грибами является важной причиной потери урожая и производственных затрат [1]. В последние годы распространенность фузариозного увядания (ФУ) и сухой гнили картофеля стремительно растет в разных регионах европейской части России, включая Среднее Поволжье [2,3], что отчасти объясняется изменением климата. Хотя установлено, что существует сильная положительная корреляция между интенсивностью засухи и высокой частотой ФУ картофеля [4], данные об этиологии фузариоза картофеля в Республике Татарстан (РТ) практически отсутствуют [5]. Согласно нашим данным по анализу микробиоты корней картофеля, культивируемого в РТ на серых лесных почвах, ризосфера и ризоплана картофеля одинаково обогащены представителями рода *Fusarium*, доля которых составляет около 10% от всего грибного сообщества корневой зоны [6].

Большинство исследований, проводимых по этиологии картофельного фузариоза, посвящены анализу микромицетов, выделенных из пораженных клубней картофеля. Очень мало известно о штаммах *Fusarium* – возбудителях ФУ, обитающих в сосудах растения картофеля, а также отсутствуют данные об их возможной роли в патогенезе сухой гнили клубней. Целью настоящей работы была характеристика изолятов *Fusarium*, выделенных

из тканей картофеля с признаками сосудистого увядания, и установление роли этих штаммов в возникновении сухой гнили при искусственном инфицировании клубней разных сортов картофеля.

Экспериментальная часть

Объектом исследования были изоляты *Fusarium* spp., выделенные из корневой шейки растений картофеля с признаками ФУ. Для выделения микромицетов использовали среду Чапека Докса. Посевы культивировали при комнатной температуре. Идентификацию изолятов проводили с помощью морфологических исследований и секвенирования региона ITS (internal transcribed spacer, внутренний транскрибируемый спейсер) гена 5.8S rRNA. Секвенированные последовательности анализировали в программе BLASTn с помощью базы данных NCBI. Для оценки восприимчивости к фузариозной сухой гнили использовали по 10 условно-здоровых клубней сортов Жуковский ранний (Ж.Р.), Регги (Р.Г) и Ред Скарлетт (Р.С.), которые искусственно инокулировали спорами (10^6 спор/мл) выделенных изолятов и затем инкубировали при 28 °С. Способность изолята поражать клубни оценивали на 21 день по доле пораженной ткани клубня с помощью 9-балльной шкалы: где 9 – отсутствие поражения ткани клубня, а 7; 5; 3 и 1 соответствуют поражению 1-20%, 30–40%, 50–60% и 60–100% ткани клубня соответственно. Индексы устойчивости сортов (CR_I) к изолятам были рассчитаны для всех 3 сортов по формуле: $CR_I = (\Sigma T_H - \Sigma T_A) / \Sigma T_H$; где T_H и T_A - оценки здоровых и пораженных клубней для данного конкретного сорта соответственно.

Результаты и обсуждение

Из корневых шеек растений картофеля с признаками сосудистого увядания были выделены 14 изолятов с характерной морфологией, которым были присвоены номера АМ1-14. Для каждого штамма проводили морфологическую характеристику. Появление беловатого хлопкового воздушного мицелия на среде Чапека с наличием веретенообразных и серповидных макроконидий, а также яйцевидных и изогнутых микроконидий указывало на возможную принадлежность этих микромицетов к роду *Fusarium* (Рисунок 1).

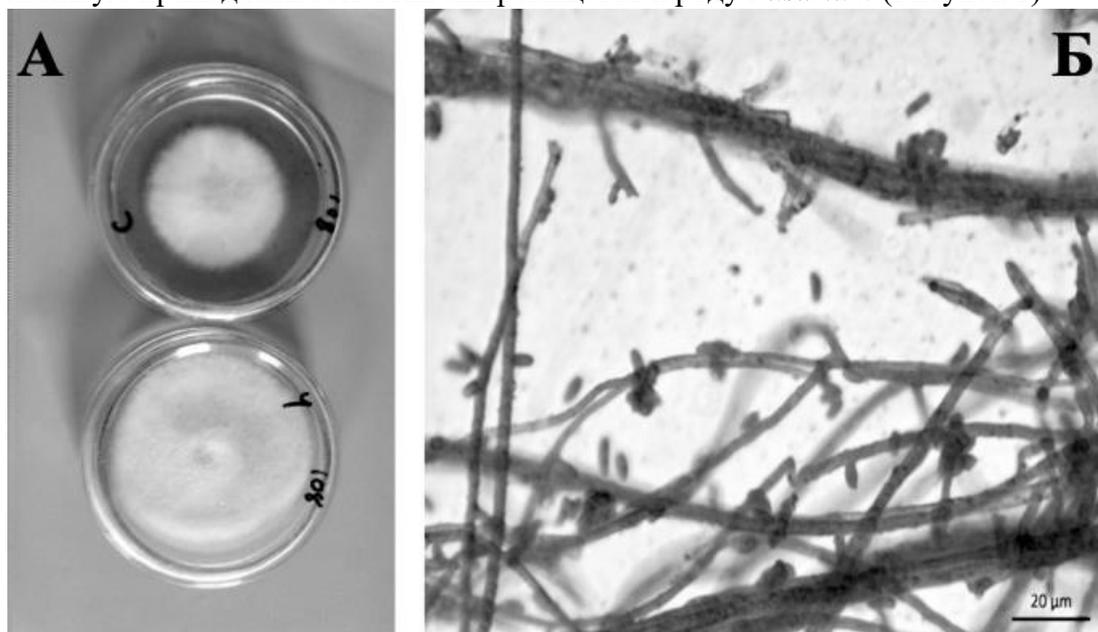


Рисунок 1. Морфологическая характеристика изолятов *Fusarium* spp. Рост воздушного мицелия изолятов на среде Чапека после 7 дней инкубации (А). Визуализация изолята под оптическим микроскопом (Б). Наличие веретенообразных и серповидных макроконидий, а также яйцевидных и изогнутых микроконидий подтверждает принадлежность к роду *Fusarium*.

Данные секвенирования ITS регионов генов 5.8 S PНК показали 97%-100% гомологию среди протестированных изолятов. По полученным данным один из выделенных изолятов (AM9) был идентифицирован как штамм *Fusarium solani*, а остальные 13 – штаммы *Fusarium oxysporum*. Эти результаты согласуются с нашими предыдущими исследованиями, согласно которым именно представители *F. oxysporum* являются основной причиной сухой гнили и латентной инфекции в клубнях картофеля, выращенного в РТ [3]. Более того, наши результаты согласуются с данными исследований, проведенных в Польше и Северном Китае, в которых также установлено, что штаммы *F. oxysporum* являлись самыми распространенными возбудителями фузариоза картофеля [7,8].

Для оценки устойчивости разных сортов картофеля к сухой гнили клубни были инокулированы чистыми культурами исследуемых микромицетов. После инкубации зараженных клубней в течение 21 сут оценивали степень их поражения. Наличие некроза светло-коричневого или черного цвета во внутренних тканях клубней свидетельствовало о наличии симптомов сухой гнили. В некоторых случаях на пораженном участке наблюдали рост мицелия в виде беловатого пушистого налета. В контрольных образцах, в которые инокулировали физиологический раствор вместо спор, не выявили визуальных признаков сухой гнили. Степень поражения клубней заметно различалось среди протестированных сортов и изолятов *Fusarium* (Таблица 1). Сравнение средних показателей целостности ткани клубня показало, что изоляты AM2, AM7, AM8 и AM9 проявляют патогенность по отношению ко всем трем протестированным сортам картофеля. В клубнях, инокулированных изолятами AM3, AM4, AM5 и AM6, не выявили признаков сухой гнили после 21 дня инкубации (Таблица 1).

Таблица 1

Оценка пораженной ткани клубня по 9-балльной шкале

Изоляты	Средняя доля пораженной ткани клубня		
	Жуковский ранний	Регги	Ред скарлетт
AM 1	8.60 ± 0.84	9.00*	9.00*
AM 2	6.20 ± 1.03	8.20 ± 1.69	7.40 ± 2.07
AM 3	9.00*	9.00*	9.00*
AM 4	9.00*	9.00*	9.00*
AM 5	9.00*	9.00*	9.00*
AM 6	9.00*	9.00*	9.00*
AM 7	4.60 ± 2.07	7.00 ± 2.67	5.00 ± 2.67
AM 8	1.20 ± 0.63	4.60 ± 2.80	6.20 ± 1.93
AM 9	6.60 ± 2.27	7.80 ± 1.69	7.40 ± 2.27
AM 10	9.00*	8.20 ± 1.32	5.40 ± 2.8
AM 11	2.20 ± 1.69	9.00*	7.40 ± 2.27
AM 12	7.00 ± 0.94	9.00*	3.40 ± 1.58
AM 13	1.80 ± 1.40	7.40 ± 2.07	9.00*
AM 14	5.80 ± 1.69	9.00*	3.80 ± 2.70

Примечание: 9.00* - отсутствие симптомов сухой гнили

Оценка по критерию Краскела-Уоллиса подтвердила, что на восприимчивость клубней к поражению микромицетами рода *Fusarium* достоверно влияет тип сорта, $H(2, N=210) = 17.201, p = 0,00018$, а также тип изолята $H(9, N=300) = 60,630, p < 0,000001$. Наивысший индекс устойчивости (0.78) проявил сорт Регги, тогда как Жуковский ранний оказался чрезвычайно чувствительным к тестируемым изолятам фузарий и имел отрицательный индекс устойчивости -0.44 (Рисунок 2).

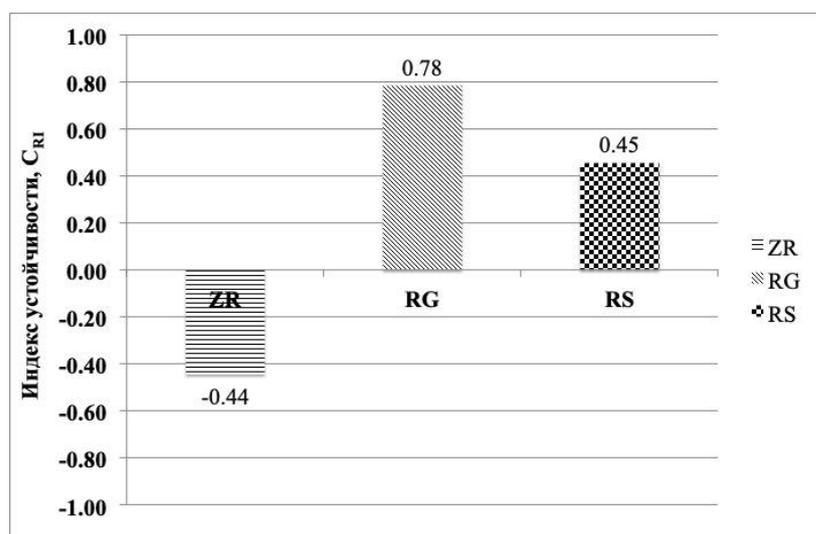


Рисунок 2: Индексы устойчивости сорта (C_{RI}) для протестированных сортов картофеля: ZR - Жуковский ранний; RG - Регги; RS - Ред Скарлетт. Положительные значения отмечены для сортов RG и RS, демонстрирующих высокую устойчивость. Сорт ZR показал значительную чувствительность к инфекции, о чем свидетельствует отрицательный C_{RI} .

Вирулентность любого изолята микроорганизма зависит от широкого спектра внешних и внутренних факторов. Известно, что представители рода *Fusarium* характеризуются высокой гетерогенностью и видоспецифичностью по отношению к растению-хозяину и обладают сложными механизмами патогенности [9,10]. Отсутствие способности вызывать сухую гниль у некоторых изолятов *Fusarium*, выделенных из растений с признаками сосудистого увядания, предполагает либо низкую адаптацию этих штаммов к клубням проверенных сортов картофеля, либо свидетельствует о том, что эти изоляты могут действовать в качестве симбиотрофов, комменсалов или даже почвенных сапрофитов. Расширение спектра тестируемых сортов картофеля важно для получения более полной картины специфичности изучаемых изолятов *F. oxysporum* к растению-хозяину.

Заключение

Полученные данные могут быть полезны при селекции клонов картофеля для культивирования на территории РТ и, возможно, в других регионах России с аналогичным типом почвы. Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что на территории РТ основным возбудителем ФУ картофеля является *F. oxysporum*. Сорт Жуковский ранний, широко культивируемый в Российской Федерации, демонстрирует высокую чувствительность к изученным изолятам *Fusarium*. Было подтверждено, что возникновение сухой гнили клубней при искусственной инокуляции спор *Fusarium* зависит как от вирулентности патогена, так и сорта растения. Также установлено, что не все изоляты, обитающие в окклюдированных сосудах картофеля, способны вызывать сухую гниль в клубнях.

Работа поддержана грантом РФФИ № проекта 19-316-90028.

Библиографический список

1. Wilson W, Dahl B, Nganje W. Economic costs of fusarium head blight, scab and deoxynivalenol // World Mycotoxin J. 2018. Vol. 7, № 2. P. 291-302

2. Замалиева, Ф.Ф., Тагиров, М.Ш., Зайцева, Т.В., Рыжих, Л.Ю. Эпифитотия фузариозного увядания на картофеле в Среднем Поволжье // Нива Татарстана. 2015. № 1. P. 21–24.
3. Хадиева Г.Ф. Лутфуллин, М. Т., Акосах, Й. А. и соавт. Анализ микромицетов рода *Fusarium*, изолированных из инфицированных клубней картофеля, выращенных в Республике Татарстан // Достижения науки и техники АПК. ООО «Редакция журнала «Достижения науки и техники АПК», 2018. Vol. 32, № 3.
4. Замалиева, Ф.Ф., Зайцева, Т.В., Рыжих, Л.Ю. and Салихова, З.З. Фузариозное увядание картофеля и рекомендации по защите // Защита картофеля. 2015. № 2. P. 3–9.
5. Nabieva L.G., Davletshina L.M. Return on Investments in the Formation of Fixed Capital Assets in Agriculture of The Republic of Tatarstan // Procedia Econ. Financ. Elsevier, 2015. Vol. 24. P. 457–463
6. Mardanova A, Lutfullin M, Hadieva G, et al. Structure and variation of root-associated microbiomes of potato grown in alfisol // World J. Microbiol. Biotechnol. Springer, 2019. Vol. 35, № 12. P. 181.
7. Du M., Ren X., Sun Q., Wang Y., Zhang R. Characterization of *Fusarium* spp. causing potato dry rot in China and susceptibility evaluation of Chinese potato germplasm to the pathogen // Potato Res. Springer, 2012. Vol. 55, № 2. P. 175–184.
8. Stefańczyk E., Sobkowiak S., Brylińska M., Śliwka J. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland // Eur. J. Plant Pathol. Springer, 2016. Vol. 145, № 4. P. 871–884.
9. Garnica M., Nucci M. Epidemiology of fusariosis // Curr. Fungal Infect. Rep. 2013. Vol. 7, № 4. P. 301–305.
10. Ma L-J., Geiser D., Proctor R., Rooney A., et al. *Fusarium* pathogenomics. // Annu. Rev. Microbiol. 2013. Vol. 67. P. 399–416.

НОВЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА *SALINISPHAERACEAE*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РУДНИКА ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ

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

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: Верхнекамское месторождение солей, бактерии семейства *Salinisphaeraceae*, гены 16S рРНК, секвенирование

В настоящее время род *Salinisphaera* (класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Nevskiales*, семейство *Salinisphaeraceae*) [1] включает в себя 7 видов. Большинство штаммов изолировано из морской воды, за исключением штаммов: *Salinisphaera halophila* YIM95161^T, выделенного из рассола соляной скважины (провинция Юньнань, Китай) [2], *Salinisphaera orenii* МК-В5^T, выделенного из пруда для добычи соли (залив Гомсо, Республика Корея) [3] и *Salinisphaera japonica* YTM-1^T, выделенного с поверхности тела *Malacocottus gibber* [4].

В результате исследований микробного сообщества рассолов и глинистых отложений рудника Верхнекамского месторождения калийно-магниевых и натриевых солей (ВКМС) были выделены галофильные бактерии. Идентификация на основе анализа генов 16S рРНК

показала принадлежность пяти изолятов к семейству *Salinisphaeraceae* (род *Salinisphaera*). Ранее из образцов воды, донных отложений рассолоборников и отходов производства калийных солей, отобранных на территории промышленных разработок Верхнекамского месторождения (г. Соликамск), также были изолированы штаммы рода *Salinisphaera* [5].

Целью настоящей работы является таксономическая и эколого-физиологическая характеристика новых бактерий рода *Salinisphaera*, выделенных из соляной шахты (Верхнекамское месторождение солей).

Для выделения микроорганизмов были использованы образцы глинистых донных отложений, отобранные из рассолоотводящих выработок и рассолоборников в одном из рудников ВКМС (Пермский край). В образцах водных вытяжек глинистых осадков были определены значения рН и общее содержание водорастворимых солей (табл. 1) [6].

Таблица 1

Содержание водорастворимых солей и рН в образцах глинистых донных отложений

Место отбора	Дата отбора	Сумма водорастворимых солей, г/кг	рН
Рассолоотводящая выработка 1	25.06.2019 (глина рыжая)	72	6.9
	01.10.2019	63	7.6
Рассолоотводящая выработка 2	25.06.2019	46	6.9
Рассолоборник 1	01.10.2019	238	6.7

Микроорганизмы выделяли методом накопительного культивирования в богатой среде Раймонда (БСР). Для приготовления БСР минеральную среду Раймонда (МСР) [7] модифицировали путем добавления триптона (5 г/л), дрожжевого экстракта (2.5 г/л) и хлорида натрия (150 г/л). Накопительные культуры (НК) получали путем добавления 1 г исследуемого образца в колбы со 100 мл БСР. После 3 недель культивирования осуществляли высеv суспензии НК на агаризованную БСР (15 г/л агара) с содержанием 150 г/л NaCl. Для дальнейших исследований отбирали колонии микроорганизмов, отличающиеся по морфологии.

Аmplификацию фрагмента гена 16S рРНК исследуемых бактериальных культур проводили с универсальными бактериальными праймерами 27F и 1492R [9] на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler («Bio-Rad Laboratories», США). Для ДНК-типирования использовали метод ВОХ-ПЦР согласно [8]. Размеры полученных ПЦР-продуктов оценивали с помощью маркера длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия).

Идентификацию бактерий проводили путем анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Для филогенетического анализа полученных нуклеотидных последовательностей (895-1405 п.н.) использовали программы Sequence Scanner v. 2.0., MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли с использованием базы данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>).

Устойчивость исследуемых изолятов к различным концентрациям хлорида натрия в среде оценивали по размеру и скорости появления колоний на агаризованной БСР. Оценку роста колоний проводили через две недели культивирования на средах с содержанием соли от 10 г/л до 300 г/л.

Рост бактерий при разных значениях рН среды и температуры культивирования определяли на агаризованной БСР при концентрации 70 г/л NaCl. Штаммы культивировали

при pH 5.0-10.0 и температуре +4-45°C. Рост учитывали на седьмой день культивирования [10].

Методом накопительного культивирования из образцов, отобранных 25.06.2019, были выделены три штамма микроорганизмов: штаммы SHV1, SHV2 – из глины рассолоотводящей выработки 1 (рыжая глина), штамм SWV1 – из глины рассолоотводящей выработки 2. Позднее из образцов, отобранных 01.10.2019, были выделены еще 2 штамма: SHV6 – из глины рассолоотводящей выработки 1, и RV14 – из глины рассолосборника 1. Сведения о pH и минерализации глинистых образцов представлены в таблице 1. При росте на агаризованной БСР штаммы формировали округлые, блестящие, прозрачные колонии желтоватого цвета, размером от 1 до 3-5 мм, с ровным краем, гладкой поверхностью, выпуклым профилем и однородной структурой.

Для определения таксономической принадлежности было проведено сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с типовыми штаммами базы данных EzBioCloud. В результате анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК было установлено, что штаммы SHV1 и SHV6 имели наибольший уровень сходства 99.89% с *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T, а штаммы SHV2, SWV1 и RV14 имели сходство с *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T на уровне 96.62%, 95.94% и 96.63%, соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК

Штамм	Типовой штамм	Номер в GenBank	Сходство, %	Кол-во нуклеотидов, п.н.
SHV1	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T	EU740416	99.89%	929
SHV2	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T	EU740416	96.62%	920
SWV1	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T	EU740416	95.94%	1405
SHV6	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T	EU740416	99.89%	895
RV14	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T	EU740416	96.63%	923

Сравнение нуклеотидных последовательностей показало, что штаммы SHV1 и SHV6 имеют идентичные гены 16S рРНК. Штаммы SHV2, SWV1 и RV14 также одинаковы по гену 16S рРНК. Однако типирование методом ВОХ-ПЦР показало различие ВОХ-профилей штаммов с идентичными генами 16S рРНК. Установлено, что исследуемые изоляты демонстрируют генетическую гетерогенность и формируют 4 геномгруппы (рис. 1).

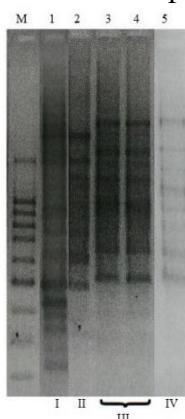


Рис. 1. Агарозный гель-электрофорез продуктов амплификации ВОХ-ПЦР исследуемых штаммов.

М – маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия), 1 – SHV6, 2 – SHV1, 3 – SHV2, 4 – SWV1, 5 – RV14. I-IV – геномгруппы.

Исследование ростовых характеристик изучаемых изолятов при различных уровнях минерализации среды показало, что SHV2 и SWV1 способны к росту на средах с содержанием NaCl от 10 до 300 г/л, в то время как SHV1 способен к росту на средах с содержанием NaCl от 10 до 270 г/л (табл. 3). Оптимальное содержание NaCl для роста всех трех изолятов составило 70 г/л. Все изучаемые штаммы являются галофильными и не способны расти в среде без добавления NaCl.

Таблица 3

Рост бактерий при различных концентрациях NaCl в среде

Штамм	Концентрация NaCl (г/л)										
	0	10	30	50	70	100	150	200	250	270	300
SHV1	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
SHV2	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SWV1	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Активный рост всех трех штаммов наблюдался на агаризованной БСР с добавлением 70 г/л NaCl при pH 6.0 и 7.0 (оптимум при pH 6.0). Культивирование бактерий при разной температуре показало, что штаммы SHV1, SHV2 и SWV1 способны к росту при температуре 28-40°C (оптимум при 28°C).

Таким образом, в образцах глинистых отложений рудника Верхнекамского месторождения солей были обнаружены пять штаммов бактерий – представителей семейства *Salinisphaeraceae*. Все штаммы являются галофильными, способны расти при pH среды 6.0-7.0 и температуре 28-40°C. Штаммы SHV2, SWV1 и RV14 имеют низкий уровень сходства с типовым видом *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T и представляют новые таксономические единицы. Дальнейшее изучение данных штаммов будет продолжено.

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

Библиографический список

1. A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order *Xanthomonadales*: proposal to transfer the families *Algiphilaceae* and *Solimonadaceae* to the order *Nevskiales* ord. nov. and to create a new family within the order *Xanthomonadales*, the family *Rhodanobacteraceae* fam. nov., containing the genus *Rhodanobacter* and its closest relatives / S. Naushad [et al.] // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2015. – V. 107 – P. 467-485.
2. *Salinisphaera orenii* sp. nov., isolated from a solar saltern / S-J. Park [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – № 8. – P. 1877-1883.
3. *Salinisphaera halophile* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from brine of a salt well / Y-J. Zhang [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – P. 2174-2179.
4. *Salinisphaera japonica* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the surface of a deep-sea fish, *Malacocottus gibber*, and emended description of the genus *Salinisphaera* / S. Yasuhiro [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – V. 63. – № 6. – P. 2180-2185.
5. Корсакова Е.С. Культивируемые аэробные бактерии из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей: дис.... канд. биол. наук: 03.02.03. – Пермь, – 2014 – 150с.
6. Практикум по агрохимии: учебное пособие / Под ред. В.Г. Минеева с соавторами. М.: МГУ, – 2001. – 689 с.

7. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop Ind Microbiol.* – 1961. – V. 2. – № 1. – P. 23-32.
8. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic [*et al.*] // *Meth Cell Mol Biol.* – 1994. – V. 5. – P. 25-40.
9. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. New York.: John Wiley and Sons, – 1991. – P. 115-175.
10. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардта с соавторами. М.: Мир, – 1983. – Т. 1-3.

ВЛИЯНИЕ ГУМАТА НА НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В КАПУСТЕ КЕЙЛ

Антех Д.Д., Тимофеева О.А.

*Казанский федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии,
кафедра ботаники и физиологии растений, Казань, Россия*

Ключевые слова: гумат, минеральное питание, флавоноиды, антиоксиданты.

Капуста кейл (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), одно из старейших капустоподобных растений, происходящих из Восточного Средиземноморья, в последнее время привлекло внимание работников здравоохранения и питания из-за его питательного профиля, который связан со снижением риска сердечных заболеваний и других хронических заболеваний. Это качество, приписываемое овощной капусте, связано с наличием полезных для здоровья фитохимических веществ, таких как витамин С, фенольные соединения, каротиноиды и флавоноиды [7].

Флавоноиды – это фенольные вещества, выделенные из широкого спектра сосудистых растений, с тысячами известных индивидуальных соединений. Многие исследования показывают, что флавоноиды действуют в растениях как антиоксиданты и проявляют биологическую активность, включая антиаллергенное, противовирусное, противовоспалительное и сосудорасширяющее действие. Антиоксидантная активность флавоноидов обусловлена их способностью уменьшать образование свободных радикалов и поглощать свободные радикалы. Чувствительные к стрессу дигидрокси-в-кольцезамещенные флавоноиды обладают большим потенциалом ингибировать образование активных форм кислорода (АФК) и снижать уровень АФК после их образования, то есть выполнять антиоксидантные функции. Суперпродукт, капуста является популярным диетическим источником флавоноидов. Хорошо известно, что на накоплению флавоноидов в растениях влияют абиотические факторы [2, 6].

Гумат калия – это коммерческий продукт, содержащий много элементов, необходимых для развития растительной жизни. Использование ГК имеет ряд преимуществ, и агрономы во всем мире принимают ГК как неотъемлемую часть в своей программе удобрений. Он вызывает ростостимулирующий эффект, обычно связанный с его гормоноподобным эффектом. Гумат калия используется в качестве недорогого источника калия. Исследователи обнаружили, что внекорневое внесение гуминовой кислоты приводит к положительному влиянию на рост и улучшение растений [3]. Таким образом, данная работа заключалась в изучении влияния гумата на содержание флавоноидов в капусте кейл. Полученные данные могут быть использованы в качестве ориентира для получения наибольшего количества флавоноидов, а также повышения биологической ценности капусты кейл.

После обработки семян в чашке Петри в течение 7 дней гуматом калиевым (К-соли гуминовых кислот и микроэлементов, 80 г/л) проростки капусты кейл были посеяны на полях. Контрольные семена обрабатывали водой в течение 7 дней. Определяли содержание флавоноидов листьях капусты кейл собранны 3 месяца после посева, по реакции с $AlCl_3$ колориметрическим методом при длине волны 420 нм [8]. Эксперименты проводились в трех независимых биологических повторностях. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft excel 2013. Достоверность различия определялась по критерию однофакторного дисперсионного анализа $*=P<0,05$.

Одним из важнейших факторов, влияющих на рост, развитие и функционирование растений, является минеральное питание. Макро- и микроэлементы играют значительную роль во всех аспектах метаболизма растений, и их доступность в достаточном количестве необходима для оптимальной физиологической деятельности. Таким образом, добавление питательных веществ обычно используется для обеспечения оптимального развития и функционирования растений [1]. При оптимизации питания в таком суперпродукте, как капуста кейл, следует учитывать и влияние на вторичный обмен веществ. Влияние гумата на биосинтез вторичных метаболитов и их накопление в растениях общеизвестно. Однако связь его влияния с содержанием флавоноидов в капусте кейл (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) еще не установлена.

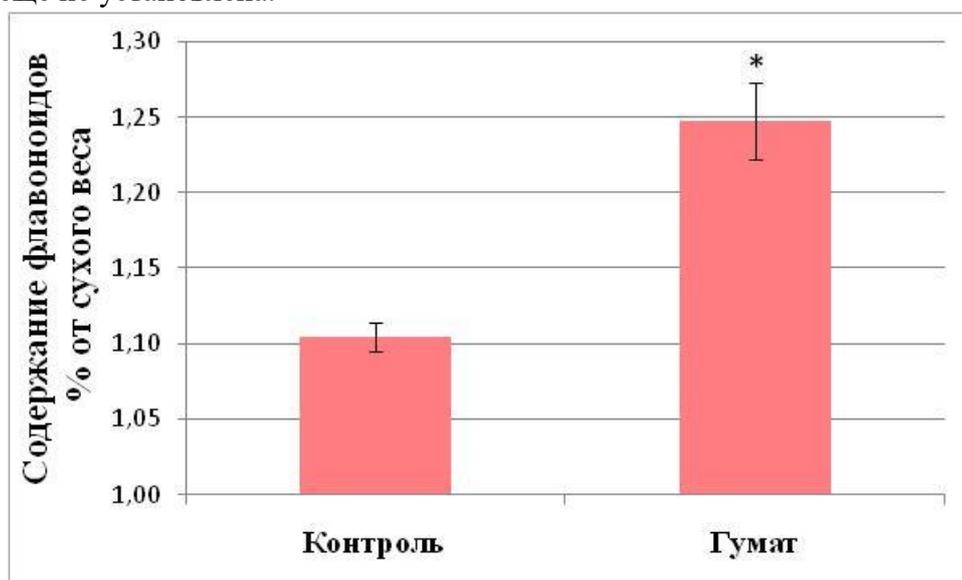


Рис.1. Влияние гумата на содержание флавоноидов в листьях капусты (*Brassica oleracea* var. *sabellica* (L.))

Капуста кейл является естественным источником полезных для здоровья антиоксидантов, таких как флавоноиды. Повышенный интерес потребителей к природным источникам фитохимических веществ делает изучение влияния факторов, влияющих на содержание этих молекул в капусте кейл, весьма перспективным направлением исследований. В нашей работе мы проанализировали влияние гумата калия на содержание флавоноидов в капусте кейл (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). В нашем исследовании мы наблюдали, что гумат положительно влияет на содержание изучаемого антиоксиданта в капусте кале (*Brassica oleracea* var. *sabellica*).

Гумат вызывал увеличение содержание флавоноидов в опытном варианте на 13% чем в контрольном варианте (Рис. 1.). Как биостимулятор, ГК, как известно, вызывает выработку различных вторичных метаболитов. Он усиливал синтез флавоноидов в

цикории. Подобный возрастающий эффект наблюдается и в нашей работе. Гуминовая кислота может генерировать активные формы кислорода (АФК), которые действуют как мессенджеры и вызывают физиологические эффекты. Согласно с учеными, сформулировавшим "гипотезу окислительного давления", биосинтез фенольных соединений следует за окислительным стрессом [4, 5]. Таким образом, можно сделать вывод, что генерация АФК гуминовой кислотой привела к увеличению содержания флавоноидов в данном исследовании.

Результаты показали, что обработка капусты кейл гуматом положительно влияет на содержание флавоноидов. Поэтому для повышения содержания флавоноидов в капусте кейл (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) можно рассматривать удобрение минеральным питательным веществом гуматом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РНФ

Библиографический список

1. Bernstein N., Gorelick J., Zerahia, R. Koch, S. Impact of N, P, K and humic acids supplementation on the chemical profile of medical cannabis (*Cannabis sativa* L) // *Frontiers in plant science*. – 2019. - Vol. 10. - P. 736.
2. Brewer M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications // *Comprehensive reviews in food science and food safety*. - 2011. – Vol.10. №. - P. 221 - 247.
3. Canellas L.P., Olivares F.L., Aguiar N.O., Jones D.L., Nebbioso A., Mazzei P., Piccolo A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. // *Scientia horticultrae*. - 2015. - Vol. 196. - P.15 - 27.
4. Ghasemi K., Bolandnazar S., Tabatabaei S.J., Pirdashti H., Arzanlou M., Ebrahimzadeh M.A., Fathi, H. Antioxidant properties of garlic as affected by selenium and humic acid treatments // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. - 2015. – Vol. 43. – №. 3 - P. 173 - 181.
5. de Melo B.A.G., Motta F.L., Santana M.H.A. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments // *Materials Science and Engineering: C* – 2016. – Vol. 62. - P. 967 - 974.
6. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants // *Journal of natural products*. - 2000. – Vol. 63 – №. 7. - P. 1035 - 1042.
7. Šamec D., Urlić B., Salopek-Sondi, B. Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement // *Critical reviews in food science and nutrition*. - 2019. – Vol. 59 – №. 15. - P. 2411 - 2422.
8. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals // *Food chemistry*. - 1999. – Vol. 64. – №. 4 – P. 555-559.

БИОРЕМЕДИАЦИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОГО ШЛАМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *RHODOCOCCUS*–БИОКАТАЛИЗАТОРА

Ахунзянова И.Р.¹, Елькин А.А.^{1,2}, Куюкина М.С.^{1,2}, Ившина И.Б.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²«Институт экологии и генетики УрО РАН» – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: нефтешлам, углеводороды, биоремедиация, биокатализатор, *Rhodococcus*.

Загрязнение наземных экосистем нефтью и нефтепродуктами – одна из приоритетных экологических проблем из-за негативного воздействия на экономическое и социальное развитие регионов, угрозы здоровью людей и состоянию природных экосистем. Нефтегазовая промышленность по опасности воздействия на окружающую среду занимает третье место в числе 130 отраслей современного производства. В нефтедобывающей отрасли ежегодное количество образовавшихся отходов на предприятиях составляет более 600 тыс. тонн; на нефтеперерабатывающих предприятиях ежегодно накапливается около 500 тыс. тонн твердых отходов, из них более 200 тыс. тонн нефтешламов [1–3]. Наиболее экономически результативным решением проблемы очистки нефтезагрязненных сред является применение экологически безопасных и относительно недорогих методов биоремедиации.

В настоящем сообщении представлены результаты исследований по оптимизации биодеструкции нефтесодержащих твердофазных отходов (нефтешлама), образующихся в процессе нефтепереработки. В работе использовали образец нефтешлама из шламонакопителя кстовского НПЗ «ЛУКОЙЛ-Нижегороднефтеоргсинтез» визуальную твердо-жидкофазной маслянистой консистенции с мелкодисперсной твердой фазой черного цвета, с резким неприятным запахом (рН 7,05), растворим в гексане, хлороформе, метаноле, дихлорметане, этилацетате. По данным гравиметрического анализа, содержание экстрагируемой хлороформом органической фракции составляло 21,6 вес. %. Фракционный состав выделенного горячей хлороформной экстракцией битумоида определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), основную долю составляет ароматическая фракция (50 %), на втором месте – тяжелые смолы (33 %) при суммарном содержании смол 42 % (отношение тяжелые/легкие смолы \approx 4). Доля асфальтенов – 7 %, около 1 % приходится на метаново-нафтеновую фракцию.

ИК-спектрометрический анализ образца хлороформенного экстракта выполнен на ИК-Фурье-спектрометре «Infracum FT-801» с использованием приставки МНПВО (многократного нарушенного полного внутреннего отражения) и программного обеспечения «ZaIR 3.5». Идентификация веществ осуществляли при помощи спектральных библиотек и литературных данных. ИК-спектр хлороформенного экстракта нефтешлама характеризуется простотой и хорошей разрешенностью. Основной комплекс полос поглощения связан с метильными и метиленовыми группами: 2900, 2800 см^{-1} ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$), 1380 см^{-1} ($-\text{CH}_3$), 1470 см^{-1} . Углеводородные радикалы преимущественно представлены разветвленными структурами ($C_3=0,45$, полоса изопробильного радикала при 1170 см^{-1}), хотя присутствовали и длинные линейные цепи с числом атомов углерода > 4 , идентифицируемые по полосе при 720 см^{-1} .

В молекулярной структуре битумоида распознаются кислородсодержащие соединения – альдегиды, кетоны, сложные эфиры (1720, 1260 см^{-1}), причем эфиры как

алифатические (плечо 1740 см^{-1}), так и ароматические. Спирты, фенолы, кислоты в спектре не определяются (отсутствие максимума ОН-групп при 3400 см^{-1}). Окисленность экстракта, в целом, невелика ($K_2 = 0,2$). Арены распознаются по поглощению при 1600 см^{-1} . Судя по интенсивности пика ($D_{1600} < 0,2$), в молекулярной структуре ведущая роль принадлежит алифатическим фрагментам. Среди ароматических соединений идентифицируются в соразмерных долях полизамещенные производные бензола (триплет полос $875, 815, 750\text{ см}^{-1}$), среди которых незначительно преобладают дизамещенные ($D_{750} > D_{815} > D_{875}$) циклы. Поглощение в области 1020 см^{-1} может быть отнесено к конденсированным системам типа нафталина (в сопряжении с полосой 750 см^{-1}), входящим в состав асфальтенов. Присутствуют также монопроизводные бензола (сопряжение полос 750 и 700 см^{-1}). По основным чертам ИК-спектр экстракта напоминает спектр тяжелой фракции сырой нефти.

Структурный анализ нефтешлама и продуктов его биотрансформации проводили хромато-масс-спектрометрическим методом (ГХ-МС) после экстракции хлороформом в щелочных (pH 12) и кислых (pH 1) условиях [4]. Использовали газовый хроматограф Agilent 6890N, снабженный кварцевой колонкой HP-5 MS SN US 1518974-1 и квадрупольным масс-спектрометром Agilent MSD 5973N в качестве детектора. Масс-спектрометрическое определение проводили методом EPA 525 (Analytical Method Guidance for EPA Method 525. U.S. Environmental Protection Agency's (EPA), 1996). По результатам ГХ-МС (рис. 1), в органической фракции нефтешлама преобладают (53,2%) длинноцепочечные *n*-алканы ($C_{17}-C_{29}$), в частности эйкозан, нонадекан, гептадекан, октадекан, хенейкозан и пентокозан, что согласуется с данными ИК-спектрометрии. Значительную (10,3%) долю углеводородной фракции составляют разветвленные алканы (изопреноиды), преимущественно двух- и трех-замещенные, пристан (тетраметилтридекан) и фитан (тетраметилтетрадекан). Хлор- бром- и фторсодержащие производные алканов и карбоновых кислот составляют 6,8%, бензoidные производные (двух- и четырех-замещенные бензолы) – 3,2%. Относительное содержание циклических алканов и нафталинов достигает 2,9 и 1,2% соответственно. В нефтешламе также присутствуют полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – 0,07% (в частности антрацен, аценафтен, аценафтилен, фенантрен, флуорен, флуорантен, пирен, хризен и бензо(а)пирен), нефтяные спирты и кислоты – 0,78% и серосодержащие компоненты – 1,35%.

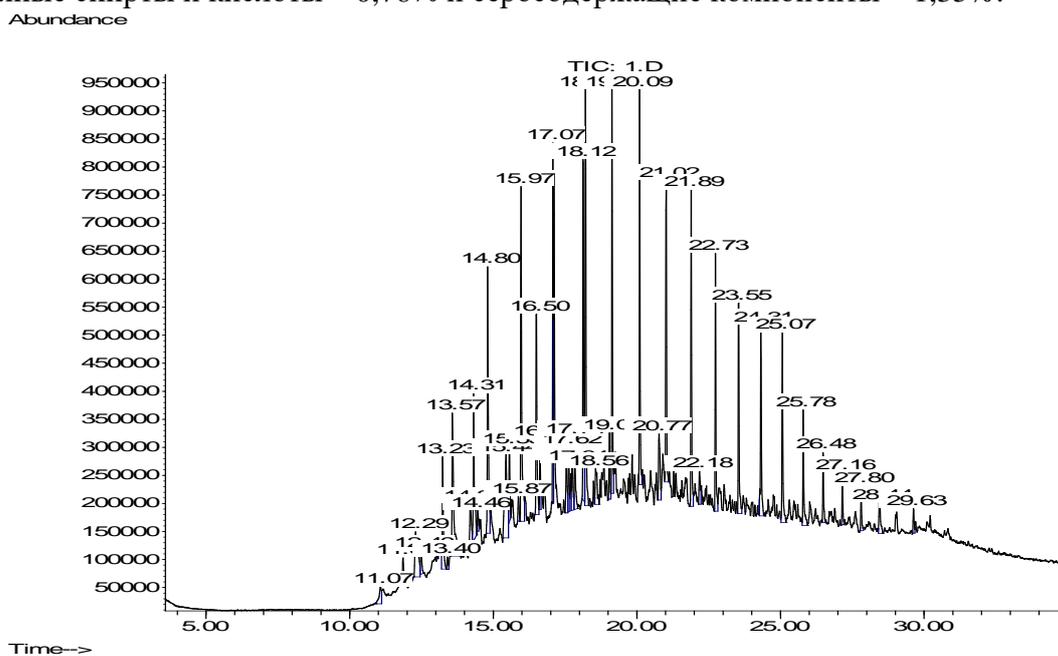


Рис. 1. Хроматограмма хлороформенного экстракта нефтешлама

Следует отметить, что твердые углеводородные шламы традиционно рассматриваются как отходы III класса опасности, то есть являются умеренно опасными. Особое внимание нами было уделено компонентному составу углеводородов, входящих в состав образца нефтешлама, в том числе концентрации ПАУ и содержанию бензо(а)пирена. Превышение его в шламах от 10 до 100 ПДК рассматривается как необходимость работы с отходами I и II классов опасности. В этом случае, как показывает практика, единственным методом, обеспечивающим перевод отхода из более высокого в наиболее низкий (IV и V) класс опасности, является биоремедиация с помощью специально подобранных культур микроорганизмов-биодеструкторов.

В качестве разрыхлителя и нефтесорбента использовали лигнин гидролизный. Экстрагируемая хлороформом органическая фракция предоставленного ООО «ВОСТОК» лигнина состояла из трех доминирующих компонентов: олеиновая кислота и два изомера фенантровой кислоты, а также из других минорных карбоновых кислот (тридекановая, пентадекановая, гексадекановая и др.), имеющих, по-видимому, растительное происхождение.

При проведении микробиологического анализа нефтешлама использовали разработанный ранее прием предварительной ультразвуковой обработки образца нефтешлама для максимальной десорбции микроорганизмов с поверхности твердых частиц [5]. Определение общей численности микроорганизмов проводили люминесцентным методом с помощью флуоресцентного микроскопа MC 400FP (Micros, Австрия), дифференциацию живых и мертвых клеток осуществляли с использованием красителя LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability Kit («Invitrogen», США). Количественный учет аэробных гетеротрофных микроорганизмов проводили традиционным методом посева на питательный агар (LB). Получали культуры накопления углеводородокисляющих микроорганизмов (УМ) в жидкой минерально-солевой среде с добавлением смеси *n*-алканов (C₁₂–C₁₇) либо дизельного топлива. Определение численности и выделение чистых культур УМ и мицелиальных грибов осуществляли путем посева серийных разведений образцов суспензии нефтешлама на агаризованную минеральную среду RS [6] в парах углеводородов.

Макро- и микроморфометрическая характеристика выделенных чистых культур нефтеокисляющих бактерий и мицелиальных грибов велась с использованием системы визуализации микроскопического изображения (тринокулярный микроскоп «Axiostar plus», Carl Zeiss, Германия, цветная цифровая камера «Pixera», США, лицензионное программное обеспечение «Видео Тест-Размер 5.0», Россия). Идентификацию природных изолятов выполняли с помощью фенотипического, хемотаксономического и молекулярно-генетического анализа. Количественный анализ доминирующих таксономических групп нефтеокисляющих микроорганизмов в образце нефтешлама проводили на основании результатов идентификации выделенных культур.

Результаты проведенного микробиологического анализа образца нефтешлама указывают на присутствие в нем микроорганизмов, обладающих способностью использовать нефтяные углеводороды в качестве единственных источников углерода и энергии. Исследованный образец характеризовался сравнительно низким ($8,7 \times 10^5$ клеток/г) содержанием УМ при высоком ($2,8 \times 10^8$ клеток/г) числе гетеротрофных микроорганизмов. Численность УМ недостаточна для естественного воспроизведения их популяции [7], что указывает на необходимость применения метода биоаугментации, то есть внесения в среду активных культур УМ. Изучение функциональной структуры микробного биоценоза показало, что для образца нефтешлама характерно сравнительно небольшое число аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий (10^5 – 10^6 клеток/г) и низкое (десятки

клеток/г) содержание нитрификаторов и сульфатредукторов. Высокая концентрация нефтезагрязнения коррелировала с присутствием большого числа мицелиальных грибов и чрезвычайно низким содержанием почвенных актиномицетов. При изучении таксономической структуры нефтеокисляющего микробиоценоза нефтешлама установлено присутствие большого количества аэробных грамотрицательных бактерий родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*, грамположительных бактерий рода *Bacillus* (*B. megaterium*, *B. brevis*) и лишь единичных представителей актинобактерий (преимущественно рода *Micrococcus*).

Исследования базировались на использовании ресурсного потенциала Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, <http://www.iegmc.ru>). На основании скрининга 67 коллекционных штаммов родококков, принадлежащих к видам *Rhodococcus erythropolis*, *R. ruber* и *R. wratislaviensis*, установлено, что все культуры характеризовались чрезвычайно слабым ростом в присутствии нефтешлама, практически неотличимым от олиготрофного роста. Внесение в среду дополнительного ростового субстрата в виде смеси *n*-алканов (C₁₂–C₁₆) способствовало активации их роста. В результате проведенного скрининга отобраны 15 штаммов, характеризующихся наиболее интенсивным ростом при одновременном внесении нефтешлама и *n*-гексадекана. На основании математического моделирования экологических взаимодействий между актинобактериями в попарных ассоциациях подобраны две ассоциации: (1) *R. erythropolis* ИЭГМ 767 и *R. ruber* ИЭГМ 230; (2) *R. erythropolis* ИЭГМ 658 и *R. ruber* ИЭГМ 470, характеризующиеся наиболее высокими ($V_a=1,29$ и $V_a=1,18$ соответственно) коэффициентами взаимодействия. Подобранные ассоциации бактерий использовались в дальнейших лабораторных экспериментах по биодеструкции нефтешлама.

В условиях твердо-жидкофазного биореактора в длительном (100 сут) эксперименте изучена динамика процесса деградации нефтешлама с использованием подобранной ассоциации родококков. Наиболее низкая (около 5%) степень биодegradации зарегистрирована в варианте с использованием шлама в качестве единственного источника углерода, в то время как внесение *n*-гексадекана (2 об.%) способствовало повышению степени биодеструкции до 17 и 30% после 30 и 100 сут эксперимента соответственно (табл. 1). При этом целевой процесс происходил наиболее интенсивно в жидкой фазе. Полученные данные свидетельствуют о низкой биодegradабельности прочно связанных с твердыми частицами компонентов нефтезагрязнения и целесообразности возможного применения биосурфактантов (биоПАВ) для их эффективной десорбции и солубилизации. Наиболее высокая (79%) степень биодеструкции нефтешлама зарегистрирована при внесении 50%-ой среды LB, указывая на возможность использования богатого источника органического питания для стимулирования процесса разложения нефтезагрязнения.

ГХ-МС анализ образцов жидкой и твердой фазы биореактора выявил присутствие галогенпроизводных, нефтяных спиртов и эфиров в остаточном загрязнении и практически полное удаление из нефтешлама *n*-алканов, *изо*-алканов и бензойных соединений (см. табл. 1).

В условиях модельных почвенных систем после внесения ассоциации родококков происходило более интенсивное формирование нефтеокисляющих бактериоценозов по сравнению с контролем (табл. 2). Численность УМ в обработанной биопрепаратом почве составляла 10⁷ клеток/г, что является достаточно высоким уровнем для обеспечения интенсивного процесса биодegradации нефтяных углеводородов. Однако дифференцированный анализ содержания представителей *R. ruber* и *R. erythropolis*, интродуцированных в составе ассоциации, выявил их сравнительно низкую численность

($5,7 \pm 0,1$) $\times 10^4$ – для *R. ruber* и ($3,8 \pm 0,1$) $\times 10^4$ – для *R. erythropolis*) в искусственных почвенных системах. Эти данные свидетельствуют о необходимости применения дополнительных приемов ремедиации с целью повышения степени биodeградебельности компонентов нефтешлама.

Таблица 1

Динамика структурно-группового состава органической фракции нефтешлама в твёрдо-жидкофазном биореакторе

Структурно-групповой состав, %	Варианты опыта					
	Минеральная среда RS + нефтешлам (30 вес.%) + ассоциация		Минеральная среда RS + нефтешлам (30 вес.%) + <i>n</i> -гексадекан (2,0 об.%) + ассоциация		Минеральная среда RS + МПБ (1:1) + нефтешлам (30 вес. %) + ассоциация	
	Жидкая фракция	Твердая фракция	Жидкая фракция	Твёрдая фракция	Жидкая фракция	Твёрдая фракция
<i>n</i> -Алканы	17,4 –	3,2 –	9,7 –	– –	– –	– –
Разветвленные алканы (изопреноиды)	9,6 –	<u>30,1</u> 11,3	7,1 –	<u>37,2</u> 14,7	– –	8,4 –
Циклические алканы	– –	1,7 –	– –	– –	– –	– –
Хлор-, бром- и фторсодержащие производные	<u>10,3</u> 30,1	<u>18,7</u> 12,5	<u>26,6</u> 32,5	<u>19,5</u> 16,0	<u>24,2</u> 34,7	<u>5,2</u> 3,0
Бензойдные производные	<u>4,9</u> 22,5	– 13,0	<u>14,7</u> 12,5	– –	– –	– –
Нафталины	– –	3,5 –	– –	2,3 –	– –	– –
Нефтяные кислоты	1,7 –	23,3 –	6,6 –	36,6 –	– –	<u>42,6</u> 18,3
Серосодержащие компоненты	5,7 –	<u>1,5</u> 2,6	8,9 –	– –	– –	– –
Нефтяные эфиры	26,8 –	4,6 –	32,9 –	<u>20,3</u> 17,0	– –	<u>31,4</u> 63,9
Нефтяные спирты	<u>15,3</u> 31,3	– –	<u>12,4</u> 25,0	– –	6,8 –	4,5 –
Нефтяные кетоны	– 11,0	– 4,4	– 31,4	– 4,5	– –	– –
Остаточная органическая фракция (вес. %)	<u>0,65</u> 3,27	<u>21,3</u> 17,6	<u>1,65</u> 0,96	<u>16,7</u> 14,5	– –	<u>12,8</u> 4,7

Примечание: приведены данные после 30 сут (в числителе) и 100 сут (в знаменателе) эксперимента. Знак “–” – не обнаружено.

В последнее время для повышения биодоступности углеводородных поллютантов часто используют сурфактанты, которые способствуют десорбции и солюбилизации углеводородов, тем самым, облегчая их ассимиляцию микробными клетками. Синтетические сурфактанты характеризуются низкой биodeградебельностью, широкое применение их приводит к накоплению потенциально опасных соединений в природной среде. Наиболее перспективным считается использование сурфактантов биогенного

происхождения, в частности нетоксичных гликолипидных *Rhodococcus*-биосурфактантов [1, 8].

Как видно из табл. 3, одновременное внесение родококков и биосурфактанта стимулировало развитие УМ, численность которых увеличивалась в 2 раза и достигала 10^8 клеток/мл.

Повышение численности УМ в вариантах с внесением родококков коррелировало с высокой степенью биодegradации нефтезагрязнения. За весь 90 сут эффективность биотрансформации шлама в почвенной системе с использованием ассоциации родококков + биосурфактант + лигнин достигала 58%, тогда как в контрольном варианте данный показатель не превышал 15% (табл. 3). При этом уже в течение первого месяца эксперимента в почвенных системах активно разрушались длинноцепочечные *n*-алканы (степень биодеструкции от 55 до 100%), разветвленные (43–50%) и циклические углеводороды (практически до нуля) и, в меньшей степени, ароматические (45–70%) и полициклические углеводородные компоненты шлама, обнаруживались галогензамещенные и окисленные продукты (спирты и кислоты) как наиболее труднодеградируемые компоненты нефтешлама.

Таблица 2

Влияние различных приемов биоремедиации на численность гетеротрофных и углеводородоксилирующих бактерий (клеток/г почвы) в лабораторных почвенных системах

Характеристика образца	Экспозиция, сут	Количество гетеротрофных бактерий	Количество углеводородоксилирующих бактерий
Нефтешлам + почва (контроль)	0	$(1,1 \pm 0,03) \times 10^5$	$(6,0 \pm 0,45) \times 10^5$
	30	$(2,5 \pm 0,30) \times 10^6$	$(6,7 \pm 0,24) \times 10^5$
	45	$(6,4 \pm 0,57) \times 10^6$	$(4,1 \pm 0,54) \times 10^6$
	60	$(8,3 \pm 0,73) \times 10^6$	$(8,8 \pm 0,57) \times 10^6$
	90	$(1,4 \pm 0,20) \times 10^7$	$(7,8 \pm 0,25) \times 10^6$
Нефтешлам + почва + ассоциация родококков + лигнин	0	$(6,4 \pm 0,60) \times 10^5$	$(6,4 \pm 0,38) \times 10^5$
	30	$(5,2 \pm 0,47) \times 10^6$	$(6,5 \pm 0,60) \times 10^5$
	45	$(3,6 \pm 0,34) \times 10^6$	$(1,6 \pm 0,19) \times 10^7$
	60	$(6,0 \pm 0,63) \times 10^6$	$(6,4 \pm 0,37) \times 10^7$
	90	$(9,1 \pm 0,82) \times 10^6$	$(8,5 \pm 0,43) \times 10^7$
Нефтешлам + почва + ассоциация родококков + птичий помет	0	$(2,3 \pm 0,27) \times 10^5$	$(6,8 \pm 0,33) \times 10^5$
	30	$(8,5 \pm 0,80) \times 10^6$	$(1,5 \pm 0,09) \times 10^6$
	45	$(1,6 \pm 0,05) \times 10^7$	$(5,6 \pm 0,45) \times 10^7$
	60	$(4,4 \pm 0,42) \times 10^7$	$(4,6 \pm 0,32) \times 10^7$
	90	$(8,8 \pm 0,86) \times 10^7$	$(1,8 \pm 0,04) \times 10^8$
Нефтешлам + почва + ассоциация родококков + <i>Rhodococcus</i> -биосурфактант	0	$(2,2 \pm 0,24) \times 10^6$	$(7,1 \pm 0,44) \times 10^5$
	30	$(6,2 \pm 0,59) \times 10^6$	$(4,4 \pm 0,03) \times 10^7$
	45	$(5,7 \pm 0,41) \times 10^6$	$(7,2 \pm 0,31) \times 10^7$
	60	$(4,0 \pm 0,15) \times 10^6$	$(2,9 \pm 0,14) \times 10^8$
	90	$(1,2 \pm 0,06) \times 10^7$	$(3,5 \pm 0,09) \times 10^8$

В варианте с использованием только разрыхлителя наблюдалось 50%-ное разрушение нефтешлама подобранной ассоциацией родококков по сравнению с применением биосурфактанта (см. табл. 3). При этом компонентный состав остаточного загрязнения в целом совпадал с таковым в варианте с внесением биосурфактанта, за исключением большего накопления галогензамещенных продуктов и нефтяных спиртов. По-видимому, разрыхлитель не обеспечивал достаточную солубилизацию нефтезагрязнения, хотя

эффективно сорбировал нефтепродукты и усиливал степень аэрации обрабатываемой почвы, приводя к ускорению процесса биодеструкции по сравнению с контролем.

Следует отметить, что внесение легкоусваиваемого органического субстрата (птичьего помета) не оказывало ожидаемого стимулирующего воздействия на процесс биодegradации нефтешлама. Напротив, при этом наблюдалось практически полное прекращение биодеструкции после 60 сут (см. табл. 3), что свидетельствует о неэффективности использования данного отхода в подобранной концентрации и целесообразности дальнейшего поиска оптимального органического субстрата для возможного усиления процесса биодеструкции шлама.

В почвенном варианте без внесения ассоциации родококков (только лигнин) процесс биоразложения нефтешлама протекал менее интенсивно, приводя к 30%-ному снижению степени загрязнения в течение 90 сут (см. табл. 3). При этом в течение первого месяца уровень нефтезагрязнения понижался почти на 42%, по-видимому, вследствие эффективной сорбции лигнином. Однако в последующие месяцы данная величина не повышалась, а даже снижалась до 30%, указывая на невысокую интенсивность процесса биодеструкции. В варианте опыта без разбавления нефтешлама чистой почвой (только внесение лигнина) процесс биодеструкции практически не осуществлялся и уровень нефтезагрязнения оставался высоким (90% от исходной концентрации) на протяжении всего эксперимента.

Таблица 3

Концентрация (вес. %) органической фракции нефтешлама в лабораторных почвенных системах

№ п/п	Вариант опыта	Экспозиция, сут				
		0	30	45	60	90
	КОНТРОЛЬ					
1	Нефтешлам + почва (1:1)	11,0	10,0	10,0	10,5	9,3
	БИОСТИМУЛИРОВАНИЕ					
2	Нефтешлам + лигнин (1:0,1) + рыхление	22,0	20,2	20,0	19,7	19,5
3	Нефтешлам + почва + лигнин (1:1:0,1) + рыхление	11,0	6,4	6,6	6,7	7,7
	БИОАУГМЕНТАЦИЯ					
4	Нефтешлам + почва + лигнин + птичий помет (1:1:0,1:0,05) + рыхление + ассоциация родококков	10,4	8,0	8,2	7,2	7,5
5	Нефтешлам + почва + лигнин (1:1:0,1) + биосурфактант + рыхление + ассоциация родококков	11,2	9,8	7,3	5,8	4,6
6	Нефтешлам + почва + лигнин + мин. соли (1:1:0,1:0,01) + рыхление + ассоциация родококков	10,6	8,0	5,0	5,5	5,6

Таким образом, полученные данные лабораторных экспериментов свидетельствуют о том, что процесс биодegradации образующегося при нефтепереработке шлама наиболее интенсивно осуществлялся в модельной почвенной системе с внесением подобранной ассоциации родококков-нефтедеструкторов, лигнина и биосурфактанта.

Работа выполнена частично при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/174.1, а частично госзадания АААА-А19-119112290010-7 и договора № 2/2017-2020 с ООО "ВОСТОК".

Библиографический список

1. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костарев С.М. Применение экологически безопасной экспресс-технологии очистки нефтезагрязненных почв и грунтов (на примере районов нефтедобычи Пермской области). Нефтяное хозяйство. 2003. 9. С. 116–118.
2. Соромотин А.В. Воздействие добычи нефти на таежные экосистемы Западной Сибири. Тюмень. Изд-во Тюменского государственного университета, 2010.
3. Черных М.С., Садчиков А.В. Нефтедеструкция и биоремедиация. Современные проблемы науки и образования. 2016. № 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25214> (дата обращения: 20.06.2020).
4. Другов Ю.С., Родин А.А. Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды и почвы. С.-Петербург, 1999.
5. Ившина И.Б., Куюкина М.С. Селективное выделение пропанооксиляющих родококков с использованием антибиотических веществ. Микробиология. 1997. 67. 494–500.
6. Электронный каталог штаммов (<http://www.iegmcoll.ru/medium/med11.html>, 20.06.2020).
7. Коронелли Т.В., Дермачева С.Г., Ильинский В.В., Комарова Т.И., Поршнева О.В. Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон. Микробиология. 1994. 63. 917–922.
8. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1998. V. 14. P. 711–717.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ИБУПРОФЕНА КЛЕТКАМИ *RHODOCOCCLUS CERASTII* ИЭГМ 1243

Бажутин Г.А.^{1,2}, Тюмина Е.А.^{1,2,3}, Ившина И.Б.^{1,3}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

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

³“Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН” – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: Ибупрофен, фармполлютанты, биотрансформация, актинобактерии, *Rhodococcus*

Ибупрофен (C₁₃H₁₈O₂; CAS: 15687-27-1; (RS)-2-(4-(2-метилпропил)фенил)пропионовая кислота) – один из наиболее часто применяемых в медицине и ветеринарии нестероидных противовоспалительных препаратов, объемы производства которого исчисляются тысячами тонн в год [1]. Тотальное потребление ибупрофена, его неполное разложение в организме животных и человека, ненадлежащая утилизация просроченных препаратов ибупрофена, а также низкая эффективность применяемых методов очистки сточных вод в отношении данного поллютанта приводят к значительным объемам его эмиссии в окружающую среду [2–4]. По данным Европейской комиссии, ибупрофен представляет значительный риск для окружающей среды вследствие выраженной его токсичности в отношении водных беспозвоночных и позвоночных животных, а также растений [5–7].

Поскольку физические и химические методы удаления ибупрофена из воды сопряжены с жесткими условиями реакции и высокими энергозатратами, а также обладают

низкой эффективностью в отношении данного фармполлютанта, всё больший приоритет приобретают биологические технологии утилизации фармацевтических загрязнителей с использованием микроорганизмов [8–10]. Значительный интерес в качестве возможных биодеструкторов ибупрофена представляют актинобактерии рода *Rhodococcus* – типичные обитатели водных и почвенных экосистем, обладающие широким спектром адаптационных возможностей, экологической пластичностью, способностью к олиготрофному метаболизму и выделяющиеся среди других микроорганизмов наибольшим разнообразием деструктируемых поллютантов [11].

В Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, реестровый номер Уникальной научной установки 73559, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, <http://www.iegmc.ru>) собран большой генофонд непатогенных штаммов родококков, способных разлагать различные ксенобиотики [12, 13]. Ранее нами было показано, что наибольшую активность в отношении фармполлютанта ибупрофена проявляет штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243 [14].

Цель настоящей работы – подбор оптимальных условий биотрансформации ибупрофена свободными клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243, исследование динамики и ключевых продуктов его метаболизации.

Эксперименты по биотрансформации ибупрофена проводили в условиях периодического культивирования (160 об/мин, 28°C) в колбах Эрленмейера вместимостью 250 мл с объемом минеральной среды RS 100 мл [15]. Ибупрофен в виде натриевой соли (Sigma-Aldrich, США) вносили в среду культивирования из стерильного концентрированного водного раствора (10 г/л) до конечной концентрации 100 мг/л. Поскольку родококки неспособны к метаболизму ибупрофена в качестве единственного источника углерода и энергии, в качестве дополнительного источника углерода и энергии испытывали 10 различных косубстратов: ацетат натрия, глюкозу, олеаноловую, фенилуксусную и гуминовые кислоты (0,1%); мясопептонный бульон (МПБ, 1,3%); глицерин, пентанол-1, гексанол-1, *n*-гексадекан (0,1 об. %).

Содержание ибупрофена в среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония). Состав продуктов биотрансформации ибупрофена анализировали с использованием жидкостного тройного квадрупольного хроматографа LCMS-8050 (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором с двойным источником ионизации (электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении).

По нашим данным, наиболее высокая убыль фармвещества клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 наблюдалась в присутствии 0,1% *n*-гексадекана в качестве источника углерода и энергии (Табл. 1). При условии использования глицерина, мясопептонного бульона и пентанола-1 в качестве дополнительных ростовых субстратов убыль ибупрофена на 7 сут эксперимента была значительно ниже – от 14,1 до 27,4%. В присутствии остальных косубстратов биоконверсии фармвещества не наблюдали.

В присутствии *n*-гексадекана полная биотрансформация ибупрофена наблюдалась на 6 сут эксперимента (Рис. 1, кривая 1). Средняя скорость биоконверсии фармвещества составляла 14,3 мг/сут, максимальные значения достигались на 4 сут и составляли 21,65 мг/сут. В это же время, по результатам ВЭЖХ, регистрировали максимум продуктов деструкции ибупрофена (Рис. 1, кривая 2). Максимальная удельная скорость биодеструкции фармполлютанта составляла 0,031 сут.

По результатам ВЭЖХ-МС, идентифицированы метаболиты микробной трансформации ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 и рассчитаны молекулярные массы возможных метаболитов (Табл. 2).

Биотрансформация ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии различных косубстратов

Биотрансформация ибупрофена, %									
Глюкоза	Глицерин	Пентанол-1	Гексанол-1	Ацетат	<i>n</i> -гексадекан	МПБ	Фенилуксусная к-та	Олеоловая к-та	Гуминовые к-ты
0	14,1±3,25	22,7±6,31	0	0	95,4±5,49	27,4±2,68	0	0	0

Примечание. Приведены результаты на 7 сут эксперимента.

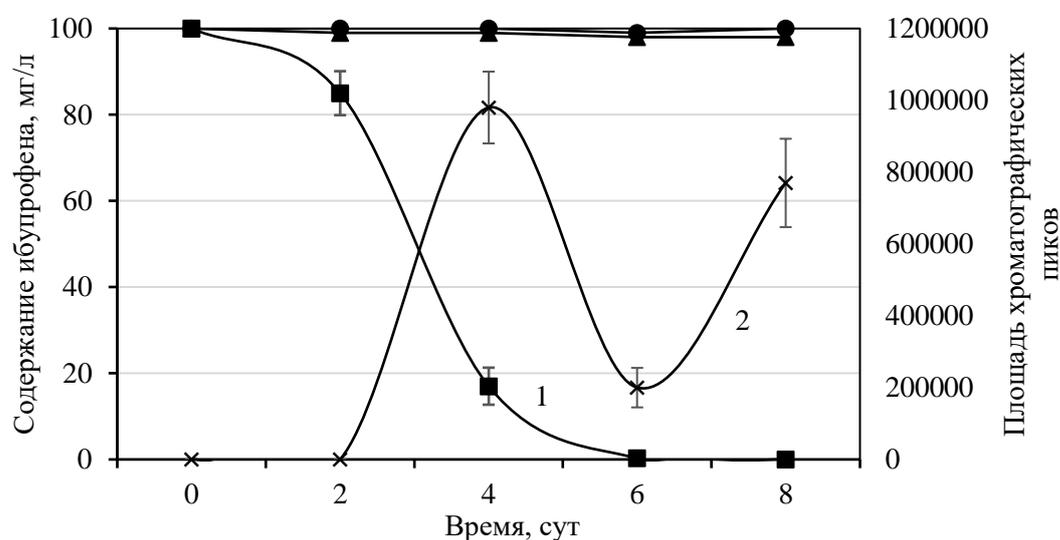


Рисунок 1. Динамика изменения содержания ибупрофена (1) и его метаболитов (2) в процессе биодеградации клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243. ● – контроль абиотической деструкции, ▲ – контроль биосорбции.

Идентификация продуктов бактериального разложения этиоксиканта позволила расшифровать пути его биотрансформации (Рис. 2). Таким образом, метаболизация ибупрофена сопровождается гидроксированием молекулы экотоксиканта (соединение 1) с образованием 9-гидроксиибупрофена (соединение 2), 2,6-дигидроксиибупрофена (соединение 3) и 9-гидроксиибупрофена (соединение 4) и их последующим декарбоксилированием (соединения 5–7). Выявление последующих преобразований гидроксированных и карбоксилированных метаболитов, образующихся в процессе биодеградации ибупрофена, требует дальнейших исследований.

Исследование поддержано Госзаданиями (АААА-А19-119031890083-9, АААА-А19-119112290008-4), грантом РФФИ (18-29-05006) и стипендиальной программой для молодых ученых “Норпексаль Фонда” (2020–2021) и Правительством Пермского края в рамках научного проекта № С-26/174.1.

Предполагаемые продукты биотрансформации ибупрофена клетками *R. cerastii*
ИЭГМ 1243

№, п/п	Формула	Название соединения
1		Ибупрофен $C_{13}H_{18}O_2$ М.м. 206,28
2		6-гидроксиибупрофен $C_{13}H_{18}O_3$ М.м. 222
3		6,9-дигидроксиибупрофен $C_{13}H_{18}O_4$ М.м. 238
4		6-гидроксиибупрофен $C_{13}H_{18}O_3$ М.м. 222
Продолжение Таблицы 2		
5		Декарбоксилированное производное 9-гидроксиибупрофена $C_{12}H_{15}O$ М.м. 175
6		Декарбоксилированное производное 6,9-дигидроксиибупрофена $C_{12}H_{16}O_2$ М.м. 192
7		Декарбоксилированное производное 6-гидроксиибупрофена $C_{12}H_{15}O$ М.м. 175

Примечание. Использована нумерация атомов ибупрофена, предложенная в работе [16].

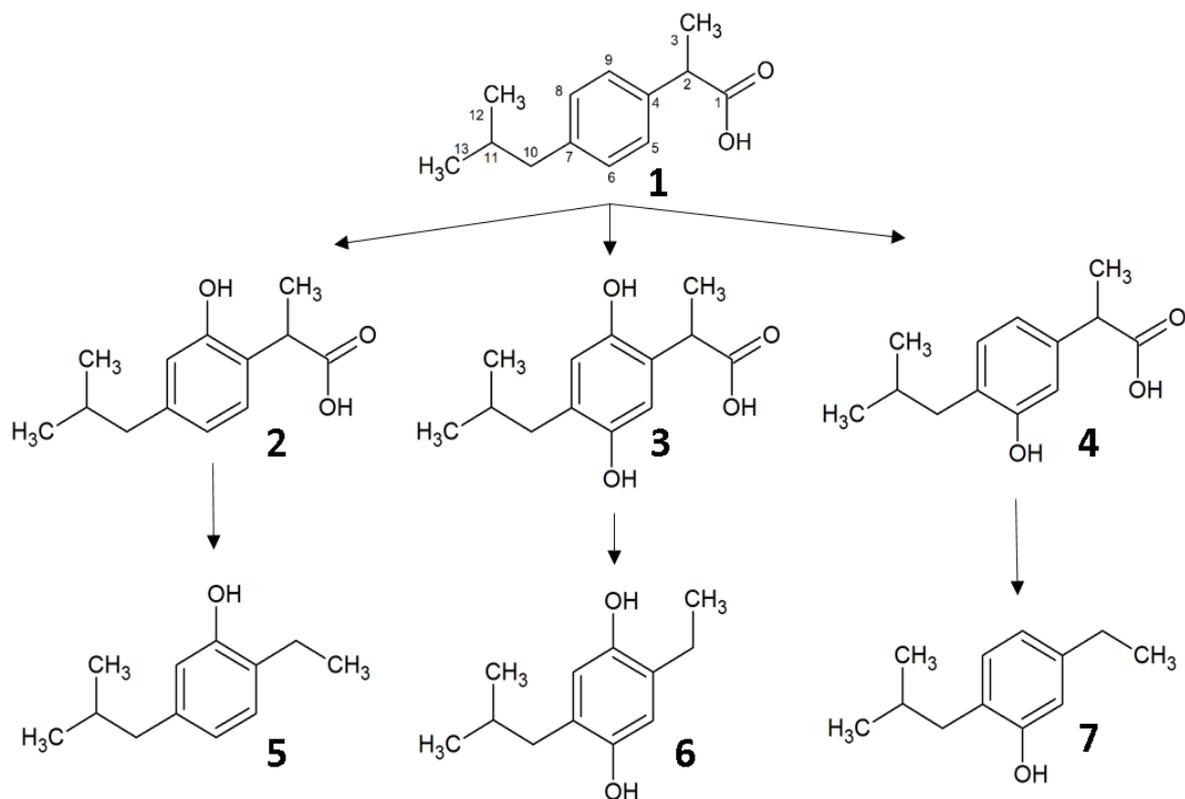


Рисунок 2. Предполагаемая схема продуктов биотрансформации ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243. 1 – ибупрофен; 2 – 9-гидроксиибупрофен; 3 – 6,9-дигидроксиибупрофен; 4 – 6-гидроксиибупрофен; 5 – декарбоксилированное производное 9-гидроксиибупрофена; 6 – декарбоксилированное производное 6,9-дигидроксиибупрофена; 7 – декарбоксилированное производное 6-гидроксиибупрофена.

Библиографический список

1. Ma Y., Zhang X., Zhu Z., Wang Y., Gao J., Cui P. Process intensification and waste minimization for ibuprofen synthesis process // *J. Clean. Prod.* – 2019. – V. 194. – P. 396–405.
2. Smook T.M., Zho H., Zytner R.G. Removal of ibuprofen from wastewater: comparing biodegradation in conventional, membrane bioreactor, and biological nutrient removal treatment systems // *Water Sci. Technol.* – 2008. – V. 57(1). – P. 1–8.
3. aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Kuster A. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2016. – V. 35. – P. 828–835.
4. González-Alonso S., Merino L.M., Esteban S., López de Alda M., Barceló D., Durán J.J., López-Martínez J., Aceña J., Pérez S., Mastroianni N., Silva A., Catalá M., Valcárcel Y. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region // *Environ. Pollut.* – 2017. – V. 229. – P. 241–254.
5. Parolini M., Binelli A., Provini A. Ecotoxicology and environmental safety chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2011. – V. 74(6). – P 1586–1594.
6. Bácsi I., B-Béres V., Kókai Z., Gonda S., Novák Z., Nagy S.A., Vasas G. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages // *Environ. Pollut.* – 2016. – V. 212. – P. 508–518.
7. Xie H., Hao H., Xu N., Liang X., Gao D., Xu Y., Gao Y., Tao H., Wong M. Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds

in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment // *Sci. Total Environ.* – 2019. – V. 659. – P. 230–239.

8. Salgado R., Brito D., Noronha J.P., Almeida B., Bronze M.R., Oehmen A., Carvalho G., Barreto Crespo M.T. Metabolite identification of ibuprofen biodegradation by *Patulibacter medicamentivorans* under aerobic conditions. *Environ. Technol. (United Kingdom)*. – 2020. – V. 41. – P. 450–465.

9. Almeida B., Kjeldal H., Lolas I., Knudsen A.D., Carvalho G., Nielsen K.L., Barreto Crespo M.T., Stensballe A., Nielsen J.L. Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11 // *Biodegradation*. – 2013. – V. 24. – P. 615–630.

10. Marchlewicz A., Guzik U., Smulek W., Wojcieszynska D. Exploring the degradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): The new pathway and factors affecting degradation // *Molecules*. – 2017. – V. 22. – Article 1676.

11. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // *In: Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications*, editor I. Kurtböke, Elsevier. – 2017. – P. 121–148.

12. Cheremnykh K.M., Luchnikova N.A., Grishko V. V., Ivshina I.B. Bioconversion of ecotoxic dehydroabiatic acid using *Rhodococcus* actinobacteria // *J. Hazard. Mater.* – 2018. – V. 346. – P. 103–112.

13. Ivshina I.B., Tyumina E.A., Kuzmina M.V., Vikhareva E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346 // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. 1–13. Article 9159.

14. Тюмина Е.А., Бажутин Г.А. Биодеструкция фармполлутанта ибупрофена актинобактериями // *Материалы региональной студенческой научной конференции с международным участием “Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии”*, Пермь. – 2018. – С. 147–150.

15. List of species and strains of IEGM Collection [Электронный ресурс] / IEGM Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms // Режим доступа: <http://www.iegmcollection.ru/strains/index.html> [05.09.2020].

16. Preskar M., Vrbanec T., Plavec J. Solubilization of ibuprofen for freeze dried parenteral dosage forms // *Acta Pharm.* – 2019. – V. 69(1). – P. 17–32.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПИЛЛАР[5]АРЕНОВ АUI-87 И АUI-97 В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ВТ-20

Баландина А. В., Шурпик Д. Н., Падня П. Л., Зеленихин П.В., Стойков И.И.
ФГАОУ ВО Казанский (приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, г. Казань, Россия

Пилларарены являются одним из видов супрамолекулярных соединений образованных из гидрохиноновых единиц соединенных метиленовыми мостиками, образуя столбчатую полую форму, в отличие от каликсаренов, которые имеют форму чаши. Подобные супрамолекулярные соединения способны участвовать во взаимодействии «гость-хозяин», однако столбчатая структура пиллараренов, благодаря большей симметричности и жесткости, имеет ряд преимуществ перед предшественниками. На основе пиллараренов проектируются системы для доставки и удерживания других молекул,

что делает их перспективными компонентами средств терапии различных заболеваний, включая противоопухолевые.

Цель нашего исследования заключалась в определении токсических свойств пиллар[5]аренов АUI-87 и АUI-97, имеющие в составе тиоэфирные сульфонатные фрагменты и тиоэфирные карбоксилатные фрагменты, соответственно, по отношению к клеткам карциномы молочной железы человека BT-20. Данные соединения планируется использовать в дальнейшем как средства доставки противоопухолевых препаратов. Изменение жизнеспособности клеток в присутствии пиллар[5]аренов детектировали в МТТ-тесте при инкубировании клеток с агентами в течение 24 ч и 48 ч. Для каждой точки данных результат получали в не менее, чем 8 повторностях. При установлении значимости различий выживаемости клеток при различных условиях эксперимента и взаимосвязи изменений жизнеспособности с концентрацией действующего агента и временем обработки, проводили однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Установлено, что пиллар[5]арен АUI-87 с сульфонатными радикалами не оказывают выраженного угнетающего жизнеспособность клеток BT-20 действия, во всем диапазоне исследованных концентраций (3-500 мкг/мл). При этом, в варианте с обработкой 50 мкг/мл пиллар[5]арена в течение 24 ч отмечено достоверное увеличение жизнеспособности клеток на $8,97 \pm 14,98$ %. При 48 ч инкубировании детектировали увеличение жизнеспособности клеток в сравнении с вариантом без обработки при внесении в пробы агента в концентрации 50 мкг/мл и 100 мкг/мл на $9,98 \pm 3,50$ % и $12,73 \pm 5,68$ %, соответственно

Эффекты пиллар[5]арена АUI-97 с карбоксилатными радикалами в отношении клеток BT-20 были схожими. Через 24 ч инкубирования фиксировали достоверное увеличение жизнеспособности клеток при обработке агентом в концентрации 100 мкг/мл и 500 мкг/мл. Значения показателя жизнеспособности для концентраций 100 мкг/мл, 500 мкг/мл превышали таковое для варианта без обработки на $8,42 \pm 18,5$ %, $9,98 \pm 12,95$ %, соответственно. 48 ч инкубирования клеток BT-20 в присутствии АUI-97 приводили к повышению жизнеспособности на $9,23 \pm 8,72$ %, $10,46 \pm 6,38$ %, $18,35 \pm 6,39$ %, $18,35 \pm 6,39$ %, $26,66 \pm 10,21$ %, для концентраций 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл.

Таким образом, нами были показаны отсутствие токсичности и незначительная стимулирующая активность пиллар[5]аренов АUI-87 и АUI-97 в отношении клеток карциномы молочной железы BT-20. Проявления действия агентов зависели как от концентрации, так и времени экспозиции.

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Безматерных К.В.¹, Смирнова Г.В.¹, Самойлова З.Ю.¹, Ушаков В.Ю.^{1,2}, Музыка Н.Г.¹,
Октябрьский О.Н.¹

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

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: *E. coli*, экспрессия антиоксидантных генов, радикалсвязывающая и хелатирующая активность растительных экстрактов

В условиях значительных колебаний климата необходимы новые стратегии для улучшения использования кормов и управления ими [1]. Одним из важных факторов

© Безматерных К.В., Смирнова Г.В., Самойлова З.Ю., Ушаков В.Ю., Музыка Н.Г.,
Октябрьский О.Н., 2020

развития кормовой базы животноводства является применение кормовых растений, содержащих высокие концентрации витаминов, полифенолов и других биологически активных веществ, обладающих антиоксидантными и адаптогенными свойствами. К числу таких растений относятся левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*), эспарцет песчаный (*Onobrychis arenaria*) и козлятник восточный (*Galéga orientális*), которые также широко применяются в народной медицине и являются компонентами ряда лекарственных препаратов. Положительный эффект многих лекарственных растений на здоровье человека и животных во многом связан с содержанием полифенолов в их составе [2]. Полифенолы проявляют радикалсвязывающую и хелатирующую активность *in vitro*, однако в аэробных условиях могут подвергаться аутоокислению и генерировать активные формы кислорода, выступая как прооксиданты [3, 4]. Антиоксидантные и прооксидантные свойства полифенолов позволяют им модулировать редокс-состояние тиолов в ферментах и регуляторных белках, взаимодействовать с путями передачи внутриклеточных сигналов и индуцировать экспрессию антиоксидантных и стрессовых генов [3, 5, 6]. Однако низкое содержание свободных полифенолов в крови и их существенная модификация при прохождении через желудочно-кишечный тракт ставят под сомнение действенность механизмов, наблюдаемых на отдельных клетках и культурах тканей, на уровне целостного организма. В связи с этим в последние годы предполагается, что кишечная микробиота, контактирующая с относительно высокими концентрациями полифенолов, может выступать как основной посредник, обеспечивающий их терапевтические эффекты на здоровье [7, 8]. В данной работе, используя бактерии *Escherichia coli* в качестве типичного представителя микробиоты кишечника и одновременно модельный организм, хорошо изученный в молекулярно-генетическом и биохимическом плане, мы изучили влияние экстрактов левзеи сафлоровидной, эспарцета песчаного и козлятника восточного на экспрессию антиоксидантных генов и устойчивость бактерий к действию H₂O₂ и генератора супероксида менадиона.

Сырьем для приготовления экстрактов служили растения, выращенные летом 2019 года на опытном участке Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства ПФИЦ УрО РАН и собранные в фазе бутонизации-цветения. Надземную часть растений (стебли, листья, соцветия) фиксировали при 90-95°C в течение 10-20 мин, а затем сушили при 50-60 °C – 3-4 часа. Полученные сухие образцы размалывали на блендере до мелкой гомогенной структуры и хранили в конвертах из крафт-бумаги в темном месте при комнатной температуре. Навеску тонко измельченного растительного материала (50 г) экстрагировали 2,5 л 50%-ного этанола в течение 48 ч без нагревания. Повторную экстракцию проводили 1,5 л 50%-ного этанола на кипящей водяной бане в течение 20 мин, а затем еще 20 мин на кипящей бане 1 л 50%-ного этанола. Объединенный фильтрат выпаривали на роторном испарителе ИКА RV10 (Германия). В качестве микробных объектов использовали родительский штамм *Escherichia coli* BW25113 из коллекции Keio и сконструированные в нашей лаборатории путем трансформации плазмид и трансдукции с фагом PI штаммы, несущие генные слияния *katG::lacZ*, *sodA::lacZ*, *katE::lacZ* и *sulA::lacZ*.

Исследуемые экстракты содержали значительное количество фенольных соединений, измеренных модифицированным методом Folin-Ciocalteu (Таблица 1). Наибольший уровень был отмечен у эспарцета, наименьший – у козлятника. Качественный состав полифенолов и экистероидов определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 (Япония) с колонкой Phenomenex C18. Анализ пиков осуществляли при длинах волн 220-380 нм. Экстракт эспарцета содержал таниновую, галловую и кумаровую кислоты, катехин, эпигаллокатехин галлат, рутин, гиперозид, изокверцетин, никотифлорин, нарингин и ряд неидентифицированных соединений. На ВЭЖХ-хроматограмме экстракта

левзеи сафлоровидной были идентифицированы пики таниновой и галловой кислот, катехина, гиперозида, никотифлорина, нарингенина и 20-гидроксиэкдизона. В экстракте козлятника восточного выявлены таниновая, галловая, кофейная и кумаровая кислоты и рутин, а также ряд неидентифицированных соединений. Полученные результаты в целом соответствуют имеющимся в литературе данным о количественном и качественном составе полифенолов в экстрактах изучаемых растений [9, 10].

Таблица 1

Содержание полифенолов и уровни радикалсвязывающей и хелатирующей активностей в экстрактах левзеи сафлоровидной, эспарцета песчаного и козлятника восточного

Экстракты	Полифенолы, мг(GAE) / г сух. веса	Радикалсвязывающая активность, IC ₅₀ , мг/мл	Хелатирующая активность, EC ₅₀ , мг/мл
Левзея сафлоровидная (<i>Rhaponticum carthamoides</i>)	32,79 ± 0,67	16,73 ± 0,29	4,90 ± 0,38
Эспарцет песчаный (<i>Onobrychis arenaria</i>)	41,57 ± 1,26	11,91 ± 0,23	5,48 ± 0,54
Козлятник восточный (<i>Galéga orientalis</i>)	18,54 ± 0,93	45,15 ± 0,45	2,49 ± 0,19
Тролокс	0	0,90 ± 0,05	нет
Дипиридил	0	нет	0,19 ± 0,004

Примечание: 0 – не обнаружено; нет – вещество не обладает данной активностью.

Радикалсвязывающую активность (РСА) экстрактов определяли спектрофотометрическим методом по их способности связывать стабильные радикалы 2,2-дифенил-1-пикрил-гидразина (DPPH[•]). Строили график зависимости ингибирующего эффекта от концентрации исследуемого образца и определяли величину IC₅₀, при которой связывается 50% свободных радикалов DPPH[•]. Следует отметить, что чем меньше значение IC₅₀, тем сильнее РСА изучаемого образца. В качестве стандарта был использован Тролокс, характеризующийся высокой РСА. Среди изученных экстрактов максимальную РСА демонстрировал экстракт эспарцета, который имел самое высокое содержание общих полифенолов, что еще раз свидетельствует об их преобладающей роли в связывании радикалов (Таблица 1). Способность испытуемых соединений хелатировать ионы Fe²⁺ определяли спектрофотометрическим методом с феррозином. График зависимости хелатирующего эффекта от концентрации исследуемого образца использовали для расчета EC₅₀, как концентрации, при которой ионы Fe²⁺ связываются на 50%. Чем меньше значение EC₅₀, тем сильнее хелатирующая способность (ХС) соединения. В качестве стандарта был использован дипиридил, характеризующийся высокой ХС. Максимальную хелатирующую способность проявил экстракт козлятника (Таблица 1).

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) экстрактов определялась методом серийных разведений на 96-луночных планшетах с использованием микропланшетного спектрофотометра xMark™ BioRad (США). В диапазоне концентраций 0.1 – 5 мг/мл (предел растворимости) экстракты всех изученных растений не подавляли рост бактерий.

Добавление экстрактов в растущую культуру *E. coli* также не оказывало влияния на скорость роста бактерий, указывая на отсутствие их токсического действия на клетки.

Для изучения влияния экстрактов на экспрессию стрессовых генов использовались штаммы *E. coli*, несущие слияния структурного гена *lacZ*, кодирующего β -галактозидазу, с промоторами исследуемых генов. Измерялась активность β -галактозидазы, по уровню которой судили о степени экспрессии изучаемого гена. Через 30 мин после добавления экстракта козлятника наблюдалось небольшое (в 1.2 раза), но статистически значимое повышение экспрессии гена *katG*, кодирующего каталазу НРІ (Рис. 1А). Ген *katG* входит в регулон, контролируемый регуляторным белком ОхуR, отвечающим на повышение концентрации H_2O_2 . Экстракты левзеи и козлятника в 1.2 и 1.6 раза повышали экспрессию гена *katE*, кодирующего каталазу НРІІ и находящегося под контролем регулятора общего стрессового ответа RpoS (Рис. 1Б). Обе каталазы участвуют в деструкции перекиси водорода, соответственно можно ожидать повышения устойчивости к H_2O_2 у культур *E. coli*, предобработанных этими экстрактами. Действительно, предварительная обработка всеми экстрактами за 30 минут до добавления оксиданта защищала бактерии от повреждающего действия перекиси водорода (2 мМ) (Рис. 1В). Антиоксидантная активность оценивалась как отношение скорости роста бактерий, предобработанных экстрактом к скорости роста бактерий, обработанных одним оксидантом. Максимальный протекторный эффект (в 1.3 раза) проявляли экстракты эспарцета и козлятника, что коррелирует с их способностью индуцировать гены *katG* и *katE*.

Через 30 мин после добавления экстрактов левзеи и эспарцета в растущую культуру *E. coli* наблюдалось небольшое (в 1.2 раза), но статистически значимое повышение экспрессии гена *sodA*, который кодирует Mn-супероксиддисмутазу и контролируется несколькими регуляторами, включая SoxRS, активируемыми в присутствии генераторов супероксида (Рис. 2А). При обработке клеток менадионом выраженное защитное действие наблюдалось для всех экстрактов. При этом наибольшую эффективность демонстрировали экстракты левзеи и козлятника (Рис. 2Б). В то же время ни один из экстрактов не влиял на экспрессию гена *sulA*, являющегося индикатором степени индукции SOS-системы, отвечающей на повреждение ДНК. Таким образом, экстракты повышали активность антиоксидантных систем, но не индуцировали SOS-систему, что указывает на отсутствие повреждающего действия на ДНК.

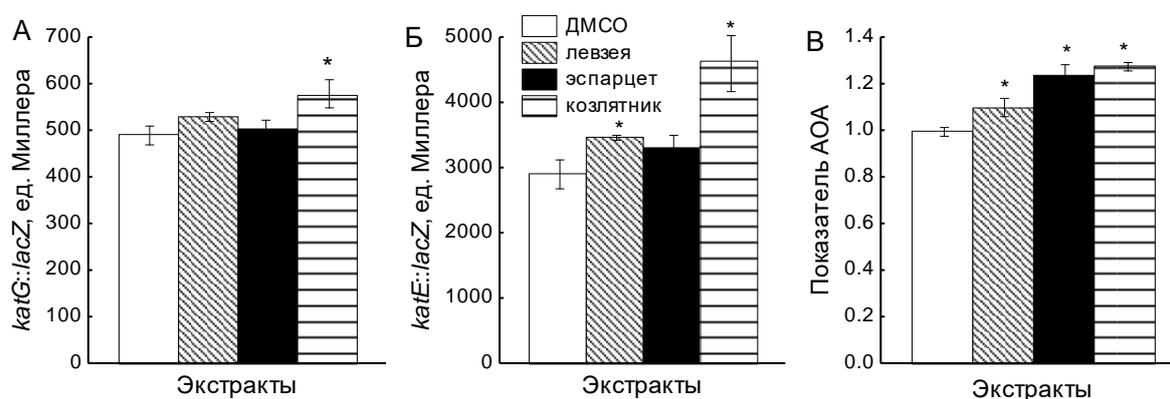


Рис. 1. Экспрессия генов *katG* (А) и *katE* (Б) через 30 мин после обработки *E. coli* экстрактами левзеи сафлоровидной, эспарцета песчаного и козлятника восточного и антиоксидантная активность экстрактов (В) через 60 мин после добавления 2 мМ H_2O_2 . Звездочкой показаны достоверные различия с контролем ($p < 0.01$).

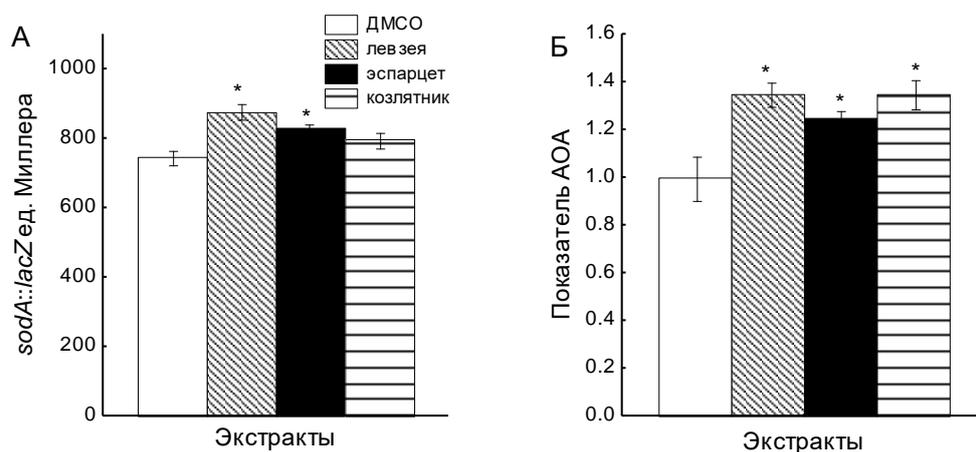


Рис. 2. Экспрессия гена *sodA* (А) при обработке *E. coli* экстрактами левзеи сафлоровидной, эспарцета песчаного и козлятника восточного и антиоксидантная активность экстрактов (Б) при действии 0.05 мМ менадиона. Звездочкой показаны достоверные различия с контролем ($p < 0.05$).

Таким образом, как в химических тестах, так и на уровне бактериальных клеток, все экстракты проявляли антиоксидантную активность, обеспечивая защитное действие от ингибирования роста *E. coli* при обработке H_2O_2 и менадионом. Экстракт козлятника, обладающий минимальной РСА, демонстрировал максимальный протекторный эффект от повреждающего действия H_2O_2 и менадиона, что может быть связано с его высокой хелатирующей активностью и способностью к индукции антиоксидантных генов при аутоокислении.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием № АААА-А19-119112290009-1 и поддержана грантом РФФИ-Урал № 19-44-590009.

Библиографический список

1. Shaheen H., Qureshi R., Qaseem M.F., Bruschi P. The fodder grass resources for ruminants: A indigenous treasure of local communities of Thal desert Punjab, Pakistan // PLoS ONE – 2020. – V. 15. – № 3. – P. e0224061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224061>.
2. Sies H. Polyphenols and health: Update and perspectives // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – V. 501. P. 2-5. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.006>.
3. Smirnova G.V., Samoylova Z.Y., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. Influence of polyphenols on Escherichia coli resistance to oxidative stress // Free Radic. Biol. Med. – 2009. – V. 46. – P. 759-768. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.017>.
4. Tang S.Y., Halliwell B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and Caenorhabditis elegans studies// Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – V. 394. – P. 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.137>.
5. Eberhardt M.V., Jeffery E.H. Perspective. When dietary antioxidants perturb the thiol redox // J. Sci. Food Agric. – 2006. – V. 86. – P. 1996–1998. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2617>.
6. Eghbaliferiz S., Iranshahi M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: Updated review of mechanisms and catalyzing metals // Phytother. Res. – 2016. – V. 30. – P. 1379-1391. <https://doi.org/10.1002/ptr.5643>.
7. Ozdal T., Sela D.A., Xiao J., Boyacioglu D., Chen F., Capanoglu E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility // Nutrients. – 2016. – V. 8. – P. 78. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>.

8. Espín J.C., González-Sarriás A., Tomás-Barberán F.A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols // *Biochem. Pharmacol.* – 2017. – V. 139. P. 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033>.

9. Kokoska L., Janovska D. Chemistry and pharmacology of *Rhaponticum carthamoides*: A review // *Phytochem.* – 2009. – V. 70. – P. 842-855. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.008>.

10. Vergun O., Shymanska O., Rakhmetov D., Grygorieva O., Ivanišová E., Brindza J. Parameters of antioxidant activity of *Galega officinalis* and *Galega orientalis* Lam. (Fabaceae Lindl) plant raw material // *Potravin. Slovak J. Food Sci.* – 2020. – V. 14. – P. 125-134. <https://doi.org/10.5219/1271>.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХ РЕДКИХ ВИДОВ РОДА *ADONIS L.* СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МЕТОДА

Бельтюкова Н.Н.¹, Томилова Ю.О.¹, Ульянов В.А.², Бейшова И.С.², Султангазина Г.Ж.², Бейшов Р.С.²

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

²Некоммерческое акционерное общество «Костанайский региональный университет имени А. Байтурсынова, г. Костанай, Республика Казахстан.

Ключевые слова: редкий вид, ценопопуляция, ISSR-метод, *Adonis*.

Для сохранения генофондов редких видов растений используют современные молекулярно-генетические методы, наряду с традиционными приемами [1]. Высокоэффективные молекулярно-генетические методы с учетом показателей генетического разнообразия, позволят сохранить генофонды редких видов растений Республики Казахстан *Adonis wolgensis* Stev. и *Adonis vernalis* L. с возможностью проведения отбора в природных условиях ценопопуляций и их групп как с наиболее типичными, так и со специфичными характеристиками генофондов.

Для изучения генофондов было выбрано 5 ценопопуляций *Adonis vernalis* L., расположенных на территории Северо-Казахстанской (Av1, Av2) и Акмолинской областях (Av3, Av4, Av5), а также 5 ценопопуляций *Adonis wolgensis* Stev., расположенных на территории Павлодарской (Aw1;Aw3), Костанайской (Aw2;Aw5) и Акмолинской областей (Aw4) Республики Казахстан.

Целью нашей работы было изучение генетического разнообразия и оценка состояния генофондов ценопопуляций *A. wolgensis* и *A. vernalis*, основанная на полилокусном маркировании с использованием межмикросателлитного метода выявления полиморфизма ДНК.

Нами была выделена ДНК из 150 образцов высушенных листьев *A. wolgensis* и из 150 образцов *A. vernalis* по модифицированной методике (из 30 растений каждой ценопопуляции) [2]. После выделения ДНК был проведен спектрофотометрический анализ на спектрофотометре SpectrofotometrTMNanoDrop 2000 («Thermoscientific», США) и определены концентрация ДНК в полученных пробах ДНК и степень их чистоты. Выявление генетического полиморфизма ДНК проводили ISSR-методом анализа полиморфизма ДНК с применением полимеразной цепной реакции и электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в агарозном геле. Каждый праймер индивидуально был проанализирован в ПЦР с тотальной ДНК каждого исследуемого вида, эффективность

праймеров оценивалась в баллах от низкой (1 балл) до высокой (5 баллов) (Таблица 1). Для дальнейшего проведения молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК были отобраны по 5 праймеров для каждого исследуемого редкого вида [2].

Исследования показали, что изученный вид *A. wolgensis* характеризуется высоким уровнем генетического разнообразия (доля полиморфных локусов (P_{95}) варьирует от 0,838 (Aw2;Aw5) до 0,888 (Aw3) и в среднем составила 0,877. Доля полиморфных локусов в общей выборке *A. wolgensis* в зависимости от ISSR-праймера колебалась от 0,555 (M3) до 1,000 (M27). Число полиморфных фрагментов ДНК варьировало от 67 (Aw1, Aw2, Aw4) до 72 (Aw3). Ожидаемая гетерозиготность по локусам в ценопопуляциях *A. wolgensis* варьировала от 0,273 (Aw2) до 0,300 (Aw1), и в среднем составила 0,285. При этом, уровень межпопуляционной дифференциации *A. wolgensis* довольно низкий ($G_{ST}=0,131$).

На основании полученных данных по ISSR-анализу полиморфизма ДНК *A. wolgensis* были определены генетические взаимоотношения между исследуемыми ценопопуляциями, составлена матрица бинарных признаков и рассчитаны матрицы генетических различий. Наименьшее генетическое расстояние [3] отмечено между Aw2 и Aw4 ($D=0,056$), а наибольшее – между Aw3 и Aw2 ($D=0,127$).

Оценка специфических особенностей генофондов проводилась по таким показателям, как число редких аллелей (R) и коэффициент генетической оригинальности (КГО) [4,5]. На основании анализа ряда параметров генетического разнообразия с преобладающей ролью показателя КГО установлено, что базовыми или типичными характеристиками генофондов обладают ценопопуляция Aw3 и Aw5 *A. wolgensis* из Павлодарской и Костанайской областей Северного Казахстана, а специфичными генофондами обладают Aw1, Aw2 и Aw4. Состояние генофондов всех изученных 5 ценопопуляций *A. wolgensis* удовлетворительное.

Таблица 1

Эффективность ISSR-праймеров при проведении ПЦР с тотальной ДНК *A. vernalis* и *A. wolgensis*

Праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'→ 3')	Температура отжига, C ⁰	Av	Aw
M1	(AC) ₈ CG	56	5	5
M3	(AC) ₈ CT	54	5	5
M27	(GA) ₈ C	52	5	5
X1	(CA) ₆ G	61	4	3
X9	(ACC) ₆ G	64	-	-
X10	(AGC) ₆ C	64	2	3
X11	(AGC) ₆ G	64	5	5
ISSR-1	(AC) ₈ T	56	-	1
ISSR-3	(TG) ₈ AA	56	-	-
ISSR-4	(TG) ₈ GC	56	3	5
ISSR-8	(GAG) ₆ C	56	4	3
ISSR-9	(ACG) ₇ G	56	5	2
CR-212	(CT) ₈ TG	56	4	4
CR-215	(CA) ₆ GT	56	4	4
CR-216	(GA) ₆ GG	56	-	-

На основании проведенного ISSR-анализа генетического полиморфизма пяти ценопопуляций адониса волжского Северного Казахстана можем заключить, что изученные

ценопопуляции этого вида характеризуются высокими показателями генетического разнообразия и низкой генетической подразделенностью ценопопуляций. В ценопопуляциях практически отсутствуют уникальные ISSR-маркеры. Сеем предположить, что выбранные ценопопуляции являются частью одной локальной популяции *A. wolgensis* на территории Северного Казахстана.

Анализ фрагментов ДНК 5 изученных ценопопуляций *A. vernalis* выявил 78 амплифицированных фрагмента ДНК, из которых 65 были полиморфными ($P_{95}=0,833$). Число амплифицированных фрагментов ДНК в суммарной выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 12 (ISSR9) до 19 (M1). В среднем при ISSR-анализе один праймер инициировал синтез 15,6 фрагментов ДНК. Число полиморфных фрагментов ДНК в суммарной выборке растений варьировало от 10 до 18, а их размеры – от 1700 до 1350 пн. Доля полиморфных локусов в общей выборке в зависимости от ISSR-праймера колебался от 0,667 (X11) до 0,895 (M1) и в среднем составила 0,833. Число полиморфных фрагментов ДНК варьировало от 28 у Av4 до 45 у Av1. Абсолютное число аллелей на локус (n_a) на общую популяцию составило 1,897. Эффективное число аллелей на локус (n_e) на общую выборку равно 1,489. В изученных ценопопуляциях *A. vernalis* обнаружено 5 редких фрагментов ДНК: 2 в Av4 и по одному Av2, Av3 и Av5. У всех изученных ценопопуляций *A. vernalis* показатель h имеет значения меньше 0,3. Анализ внутривидового разнообразия *A. vernalis* с применением показателя μ выявил, что из 5 изученных ценопопуляций большей равномерностью распределения частот аллелей характеризуется ценопопуляция Av4 ($\mu=1,475$), а наименьшей ($\mu=1,628$) – ценопопуляция Av1. Ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в общей выборке (H_T) *A. vernalis* составила 0,291, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_S) в ценопопуляциях *A. vernalis* равна 0,190 что ниже, чем определенная ожидаемая гетерозиготность в популяциях *A. vernalis* Пермского края (0,290) (Таблица 2) [1].

Таблица 2

Показатели генетического разнообразия *A. vernalis* и *A. wolgensis* на основании полиморфизма ISSR-маркеров

Вид / показатели	Aw	Av
H_E	0,285 (0,019)	0,190 (0,002)
n_a	1,926 (0,264)	1,897 (0,305)
n_e	1,550 (0,296)	1,489 (0,339)
P_{95}	0,877	0,833
R	1	5
μ	1,698 (0,008)	1,554 (0,007)
h	0,144 (0,004)	0,219 (0,004)
I	0,492 (0,045)	0,288 (0,122)

Примечание: H_E – ожидаемая гетерозиготность; n_a – абсолютное число аллелей на локус; n_e – эффективное число аллелей на локус; P_{95} – доля полиморфных локусов; R – редкие фрагменты; μ – среднее число морф; h – доля редких морф; I – информационный индекс Шеннона; в скобках даны стандартные отклонения

Таким образом, ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_s) в ценопопуляциях *A. vernalis* ниже, чем в общей выборке. Наименьшие показатели доли гетерозиготных генотипов (H_s) отмечены у праймера X11, определенная им ожидаемая гетерозиготность составляет 0,153; а самые высокие значения этого показателя отмечены у *A. vernalis* при ПЦР с праймером M27 ($H_s = 0,216$). Наблюдаемое генетическое разнообразие *A. vernalis* сосредоточено внутри популяций ($G_{ST}=0,348$). Данные показатели были сопоставлены со значениями, полученными у 10 популяций *A. vernalis*, расположенными в Пермском крае Российской Федерации ($G_{ST}=0,399$). Наименьшее генетическое расстояние отмечено между Av3 и Av5 ($D=0,141$), а наибольшее – между Av1 и Av4 ($D=0,281$).

По результатам ISSR-анализа генетического полиморфизма 5 ценопопуляций выявлено, что изученные ценопопуляции имеют высокие показатели генетического разнообразия. В 4 ценопопуляциях *A. vernalis* были обнаружены редкие фрагменты ДНК. Четвертая ценопопуляция *A. vernalis* (Av4) имеет более низкие показатели генетического разнообразия ($P_{95} = 0,424$; $H_e=0,179$, $n_a=0,500$), по сравнению с другими ценопопуляциями этого вида, изученными на территории Северного Казахстана. Наибольшее генетическое разнообразие зафиксировано в самых северных ценопопуляциях Костанайской области, ниже эти показатели в ценопопуляциях Акмолинской области.

Для оценки генетического разнообразия был использован коэффициент генетической оригинальности. Высокие значения КГО свидетельствуют о повышенном присутствии редких аллелей, а низкие значения характерны для популяций, где редкие аллели практически не встречаются [4]. Максимальное значение КГО отмечено в ценопопуляции Av5, а минимальное – в Av3. Генофонды ценопопуляций Av1 и Av3 характеризуются как типичные, а Av2, Av4 и Av5 – как специфичные. Состояние четырех из пяти изученных ценопопуляций адониса весеннего характеризуется как удовлетворительное, в ценопопуляции *A. vernalis* Акмолинской области отмечаем обеднение генофонда. Показатели КГО ценопопуляций *A. vernalis* Северного Казахстана ниже по сравнению с ценопопуляциями Пермского края Российской Федерации, определенными ранее. Это может быть связано с более центральным расположением ценопопуляций *A. vernalis* Северного Казахстана в ареале вида. В Пермском крае изучались самые северные местообитания этого вида в его ареале. В четвертой ценопопуляции *A. vernalis* отмечается обеднение генофонда, генофонды остальных изученных ценопопуляций этого вида в удовлетворительном состоянии.

Таким образом можем заключить, что изученные ценопопуляции адониса волжского и адониса весеннего характеризуются довольно высокими показателями генетического разнообразия, выше эти значения в ценопопуляциях *A. wolgensis*. Из 10 изученных ценопопуляций двух видов рода *Adonis* L. только в одной отмечено обеднение генофонда. Генетическая подразделенность значительно выше в ценопопуляциях адониса весеннего. На основании полученных данных, совместно с анализом других популяционных характеристик, будут разработаны действенные меры охраны для ценопопуляций *A. vernalis* и *A. wolgensis* Республики Казахстан.

Работа выполнялась в рамках проекта грантового финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2018-2020 гг. № AP05132458 «Молекулярно-генетический анализ генофондов популяций редких видов растений Северного Казахстана», № государственной регистрации 0118РК00404.

Библиографический список

1. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края: монография / С.В. Боронникова. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2013. 239 с.

2. Бельтюкова Н.Н., Пришнивская Я.В., Томилова Ю.О., Ульянов В.А., Бейшова И.С., Султангазина Г.Ж., Бейшов Р.С. Подбор эффективных ISSR-праймеров для редкого вида *Adonis wolgensis* Stev. // Современные научные исследования и разработки. 2018. № 08(25). URL: <http://olimpiks.ru/zhurnal-sovremennyye-nauchnyye-issledovaniya-i-razrabotki> ISSN 2415-8402. [Дата обращения 15.04.2019].

3. Nei M. Molecular evolutionary genetics. N.Y.: Columbia Univ. press, 1987. 512 p.

4. Боронникова С.В. Молекулярное маркирование и генетическая паспортизация ресурсных и редких видов растений с целью оптимизации сохранения их генофондов // Аграрный вестник Урала. 2009. №2 (56). С. 57-59.

5. Потокина Е.К. Методы классификации внутривидового разнообразия по результатам молекулярного маркирования / Е.К. Потокина, Т.Г. Александрова // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: Материалы Всероссийской конф. - Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2008. Ч. 3. С. 62-65.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНДИКАТОРЫ ДИСБАКТЕРИОЗА У ЩЕНКОВ БЕЛЬГИЙСКОЙ ОВЧАРКИ (МАЛИНУА)

Богуш Е.В., Крылова И.О.

ФГК ВОУ ВО «Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации», г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: кишечный микробиоценоз, дисбиоз, функциональное состояние, щенки бельгийской овчарки (малинуа).

В условиях вольерного содержания служебных животных, на кинологических городках особенно выражено формирование общего микробиоценоза. Интенсивность воздействия микробиологических факторов может превышать компенсаторные возможности экологической системы «организм хозяина - его микрофлора», поэтому одним из проявлений нарушения этого баланса является кишечный дисбактериоз.

Исследование проводилось на учебном комплексе кинологического факультета Пермского военного института войск национальной гвардии Российской Федерации.

Объект исследования: щенки породы бельгийская овчарка (малинуа).

Цель: изучение функционального состояния щенков бельгийской овчарки (малинуа) по кишечному микробиоценозу.

Задачи:

- проанализировать функциональное состояние особей анализируемой выборки по кишечному микробиоценозу;
- разработать практические рекомендации по поддержанию кишечной микробиоты щенков.

В период исследования щенки находились на натуральном кормлении. В качестве витаминно-минеральной подкормки применялся препарат «Полидекс Гелабон», рекомендованный к применению щенкам до полного формирования костной и хрящевой ткани.

Проведено динамическое исследование кишечной микробиоты щенков в возрасте 2,5 - 5,5 месяцев, согласно Методическим рекомендациям [1]. Микроскопическое исследование фекалий животного, химический анализ проводили согласно общепринятым методам [2]. Диагностику на наличие в фекалиях яиц гельминтов проводили методом нативного мазка [3]. Часть анализов на выделение и идентификацию бактерий желудочно-кишечного тракта проводилась в лаборатории ГБУВК «Пермский ветеринарный диагностический центр».

Бактериальный анализ функционального состояния кишечника щенков выявил, что нормобиота кишечника представлена споровыми анаэробами и лактобактериями рода *Lactobacillus*. В пробах, отобранных для анализа кишечной микрофлоры отмечен дисбактериоз по бифидобактериям. Бактерии данной группы, осуществляющие бифидоброжение, играют большую роль в функционировании желудочно-кишечного тракта. Благодаря их жизнедеятельности, снижается способность к размножению патогенных и условно-патогенных бактерий (эшерихии, клебсиеллы, сальмонеллы, протей, шигеллы, стрепто- и стафилококки, вибрионы, кампилобактерии, клостридии и др.), нормализуя микробиоценоз в целом. Симбиоз с микроорганизмами пристеночного пищеварения обеспечивает организм животного важными витаминами и биологически активными компонентами [5, 6]. Недостаток бифидобактерий у щенков восполнен бактериями лактогруппы. Лактобактерии осуществляют собственно молочнокислое брожение, принимают участие в обмене углеводов, белков, липидов, нуклеиновых кислот. Установлена важная роль лактобактерий в становлении иммунитета у новорожденных щенков, в стимулировании продукции иммунорегуляторов – интерферонов и интерлейкинов [6, 7].

Таким образом, скрининг экспериментальных данных показал, что доля нормальной микрофлоры кишечника щенков составила 58,3%. Известно, что снижение количества бифидобактерий, лактобактерий или и тех и других вместе на 1-2 порядка свидетельствует о первой степени дисбактериоза. Дисбактериоз - нарушение нормофлоры кишечника, на первый взгляд кажущееся незначительным, может стать базой опасных дисфункций [4].

Выявленные условно-патогенные микроорганизмы в пробах представлены грамположительными бактериями семейства *Enterococcaceae*, род *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*). Наличие бактерий *E. faecium* отмечено в смешанных пробах фекалий щенков в 100% проб. Согласно СП 1.3.3118-13 энтеробактерии относятся к IV группе патогенности – условно-патогенные микроорганизмы [8]. Доля условно-патогенных микроорганизмов, представленных энтеробактериями, составила 16,7%.

Доля группы микроорганизмов, представленных бактериями рода *Escherichia* (*E. coli*), составила 25%. Бактерии кишечной палочки выявлены во всех отобранных пробах и это усугубляет ситуацию по дисбиозу. Существуют данные, что вторая степень дисбактериоза определяется при наличии одного вида условно-патогенных микроорганизмов. Также это может свидетельствовать и о сниженном иммунитете. Известно, что в детском возрасте дисбактериоз развивается достаточно быстро, в связи с ферментативной и иммунной незрелостью кишечника [9].

Динамические наблюдения за функциональным состоянием щенков бельгийской овчарки выявили, что соотношение основных групп бактерий кишечного микробиоценоза имело вид: 58,3% : 16,7% : 25,0% (вторая степень дисбиоза, компенсированная).

Разработаны следующие рекомендации по поддержанию и улучшению микрофлоры кишечника собак служебных пород:

- к проблеме профилактики и лечения дисбактериозных состояний применять комплексный подход;
- восстановление состава и функциональной активности нормальной микрофлоры проводить используя мероприятия: очищение кишечника; дегельминтизацию; использование пробиотиков и пребиотиков; применение кормовых добавок и иммуностимуляторов; полноценное питание (с достаточным количеством клетчатки, кисломолочные продукты); соблюдение малошлаковой диеты; избежание стрессовых ситуаций; мониторинг физикального обследования; динамический срез состояния микрофлоры, особенно в период взросления щенка, когда ферментативная незрелость

кишечника особенно реагирует на факторы внешней среды, содержание, кормление различными видами корма.

Библиографический список

1. Методические рекомендации «Методы бактериологического исследования условно-патогенных микроорганизмов в клинической микробиологии». Утверждены Министерством здравоохранения РСФСР от 19 декабря 1991 г.
2. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т.С. Костенко, Е.И. Скаршевская, С.С. Гительсон. - М. : Агропромиздат, 1989. – 272 с.
3. Инструкция мероприятий по предупреждению и ликвидации заболеваний животных гельминтозами Министерством сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации, 1999 г.
4. Болотовский Г.В. Опыт практикующего врача по ведению пациентов с дисбактериозом / Г.В. Болотовский // Индивидуальные подходы к проблеме дисбактериоза: тез. докл. науч.-практ. сем. 5 июня 2003 г. - М., 2003. - С. 41-45.
5. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания / В.К. Ильин, А.И. Воложин, Г.В. Виха; Ин-т мед.-биол. Проблем. – М.: Наука, 2005. – 276 с.
6. Шалабот Н.Е. и др. - Кормление домашней собаки (эволюционные, этологические и физиологические аспекты – Пермь: ПВИ ВВ МВД России, 2010. – 400 с.
7. Садыкова Ю.Р. Иммунология: Курс лекций. Пермь: ПВИ ВВ МВД России, 2014. 272 с.
8. СанПиН 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности).
9. Бельмер С.В. Антибиотик-ассоциированный дисбактериоз кишечника / С.В. Бельмер // Русский медицинский журнал. - 2004. - Т. 12. - № 3. - С. 148-151.

РЕАКЦИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОЧВЫ НА РАЗЛОЖЕНИЕ ПОЖНИВНО-КОРНЕВЫХ ОСТАТКОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Бражкина П.С., Алёшин М.А., Ткачук К.С.

ФГБОУ ВО Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика Д.Н. Прянишникова, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: состояние микробного сообщества, пожнивно-корневые остатки, аммонификация, нитрификация.

Введение. Солома зерновых и зернобобовых культур является существенным резервом пополнения органического вещества и элементов питания в почве, не требующим дополнительных затрат на производство, транспортировку и внесение [5]. При разложении пожнивно-корневых остатков сельскохозяйственных культур происходит изменение физико-химических и агрохимических свойств почвы, в связи с чем, существенно изменяются условия для обитания отдельных групп микроорганизмов.

При определенных условиях имеющиеся в почве минеральные формы азота переходят в недоступные для растений соединения. Один из таких процессов возникает вследствие бурного развития микроорганизмов, которые потребляют азот и переводят его в белок цитоплазмы. Подобный процесс называют иммобилизацией азота.

После отмирания микроорганизмов белковые вещества минерализуются и превращаются в аммиак. Иммобилизация азота наблюдается, например, при внесении в почву значительной массы соломы или соломистых удобрений. В результате

иммобилизации использование азота растениями заметно снижается, что приводит к уменьшению урожая.

Почвенные микроорганизмы деструкторы очень чувствительны к углеродно-азотному (C : N) соотношению в органическом веществе. Превращение азотсодержащих соединений по пути минерализации или иммобилизации, полностью определяется соотношением азота и углерода в органическом веществе, вносимом в почву. Если субстрат имеет узкое соотношение C : N, то при его разложении накапливается аммиак, так как микроорганизмам не хватает углеродсодержащих соединений для ассимиляции азота. При внесении в почву органической массы богатой углеводами и бедной азотом, происходит потребление минерального азота [3].

Особую ценность с точки зрения содержания питательных элементов и, прежде всего, азота представляет солома зерновых бобовых культур (горох, вика) и многолетних бобовых трав (однолетних трав) содержится примерно ½ часть азота от хозяйственного его выноса урожаем, а первого года пользования в 1,5 раза больше.

Цель исследования – оценить реакцию микробного сообщества дерново-подзолистой почвы при разложении пожнивно-корневых остатков сельскохозяйственных культур.

Методика исследования. На базе ФГБОУ Пермский аграрно-технологический университет имени Д.Н. Прянишникова был заложен лабораторный опыт по изучению реакции микробного сообщества на разложение ПКО сельскохозяйственных культур.

В ПКО бобовых наиболее узкое соотношение между углеродом и азотом, в связи с этим, минерализация остатков бобовых и зерно-бобовых культур протекает интенсивно. Отсюда схема опыта представлена следующими вариантами:

1. Пшеница 100% (контроль);
2. Пшеница 75% + горох 25%;
3. Пшеница 50% + горох 50%;
4. Пшеница 25% + горох 75%;

Повторность опыта 6-ти кратная. Для выдерживания заданного весового соотношения ПКО пшеницы и гороха использовалась пожнивная часть (солома) данных культур.

Для закладки опыта использовались сосуды, вмещающие 3 кг абсолютной сухой тяжелосуглинистой дерново-подзолистой почвы. Почву отбирали с опытного поля Пермского ГАТУ.

Почва опытного участка – дерново-подзолистая тяжелосуглинистая, характеризуется низким содержанием гумуса, средней емкостью катионного обмена, высокой степенью насыщенности основаниями. Реакция среды слабокислая, обеспеченность подвижными формами фосфора и калия – повышенная. Данные условия на почвах сельскохозяйственного использования могут влиять возрастание микробиологической активности. Наиболее интенсивно развиваются микроорганизмы, принимающие участие в минерализации органического вещества, в превращении азотсодержащих органических и минеральных соединений, обмен веществ и потоков энергии при разложении и синтезе органических соединений, переход трудноусвояемых соединений питательных веществ в формы, легкодоступные для растений и микроорганизмов, происходят при непосредственном участии ферментов.

Для интенсивного протекания процесса разложения ПКО и поддержания высокой микробиологической активности проводился ежедневный полив сосудов.

По истечению 30, 60 и 90 дней после закладки опыта производился разбор сосудов с последующим отмыванием и высушиванием растительных остатков, определением минеральных форм азота. Для оценки направленности и интенсивности микробиологических процессов проводили определение численности отдельных групп

микроорганизмов. Для проведения общего микробиологического анализа провели посев микроорганизмов на плотные среды. Мясо-пептонный агар (МПА) учитывает численность сапрофитных микроорганизмов, использующих в качестве источника питания органические формы азота и крахмало-аммиачный агар (КАА) выявляет численность микроорганизмов, усваивающих минеральные формы азота. Все засеянные чашки проходят инкубацию в термостате. Соотношение КАА : МПА показывает отношение общей численности микроорганизмов, использующих минеральный азот к общему числу микроорганизмов, разлагающих органическое вещество, отражающее степень участия микрофлоры в процессе трансформации органического вещества почвы.

Нитратную азот определяли с дисульфифеноловой кислотой. Определение аммонийного азота в образцах проводили колориметрическим методом по Е.В. Аринушкиной. Статистическую обработку результатов проводили посредством использования пакета программ MS Excel.

Результаты исследования. Содержание азота в почве прежде всего зависит от таких факторов как её тип, механический состав, окультуренность и содержание гумуса. Нитраты и обменный аммоний являются основными источниками азота, обеспечивающими питание растений.

Динамика нитратного азота в почве – один из показателей скоростей трансформации азотсодержащих органических соединений. Процессы синтеза и разложения органического вещества почвы, минерализации и иммобилизации азота тесно взаимосвязаны (рис. 1).

По данным графика мы видим, что происходит накопление нитратного азота, это обосновывается тем, что нитратная форма азота в отличие от аммонийного обладает высокой подвижностью, накопление ее в почве обуславливает активностью процесса нитрификации и интенсивностью работы микроорганизмов. По истечению 30 и 60 дней происходит медленное накопление нитратного азота, по истечению 90 дней происходит резкое накопление нитратов во втором и четвертом варианте, и снижение нитратов в первом и третьем вариантах.

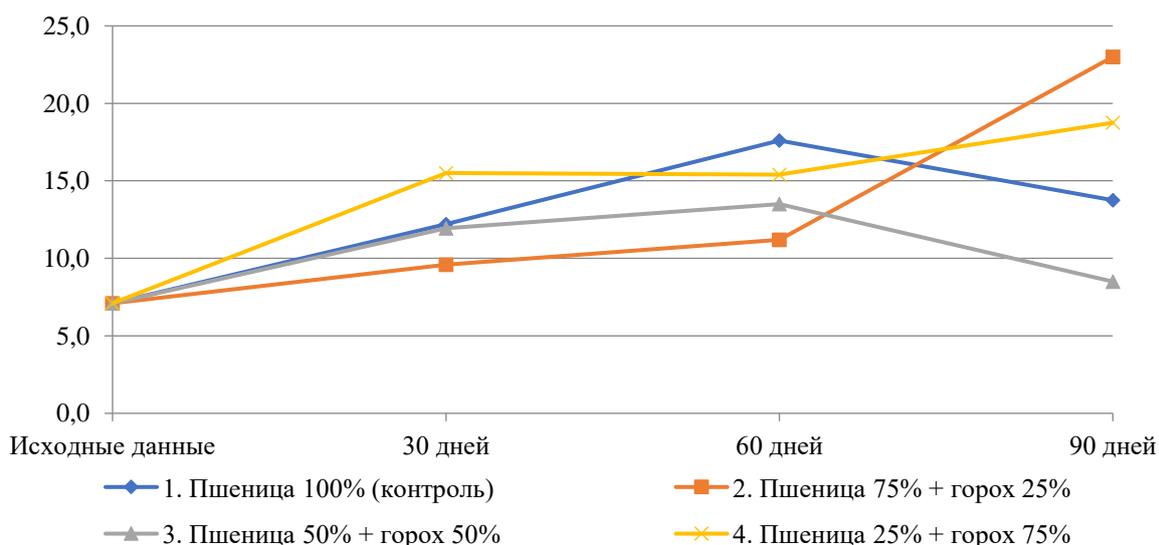


Рис. 1. Динамика нитратного азота при разложении ПКО пшеницы и гороха

Аммонийный азот в почвах слабо мобилен, поскольку вовлекается в обменные процессы с почвенным поглощающим комплексом. Независимо от типа почв, динамика его

содержания довольно монотонна. На режим аммонийных соединений в почве существенно влияют гидротермические условия: при избыточном или недостаточном увлажнении холодной погоде количество его возрастает. Динамика аммонийного азота представлена на рис. 2.

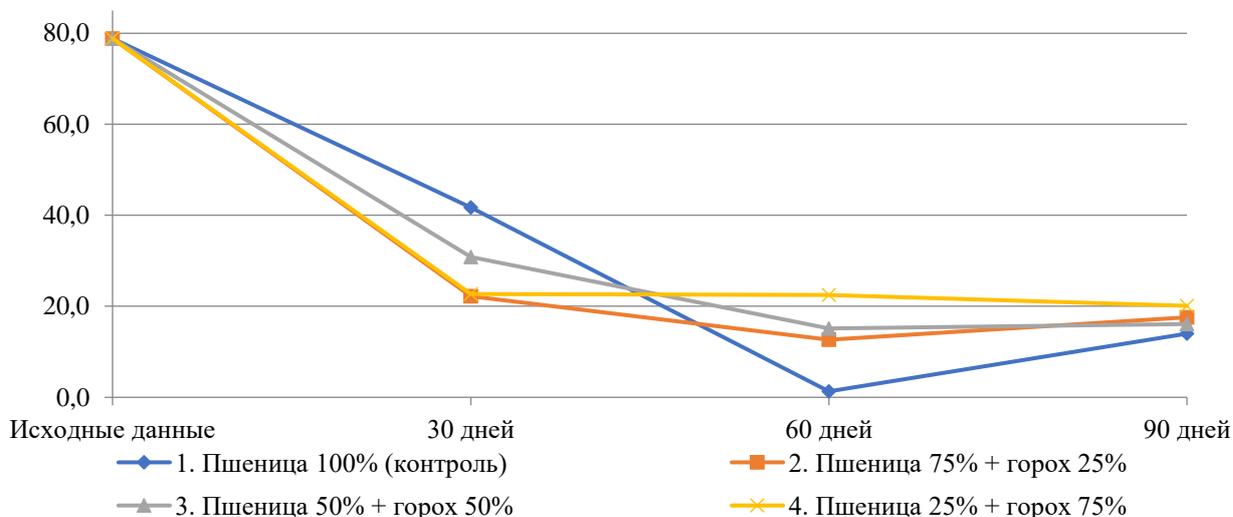


Рис. 2. Динамика аммонийного азота при разложении ПКО пшеницы и гороха

По графику видно, что с течением времени происходит снижение аммонийного азота. По истечению 30 дней фиксация содержания аммонийного азота снижается, при добавлении гороха снижение более существенное. По истечению 60 дней происходит дальнейшее снижение данного показателя, а по истечению 90 дней существенных изменений не наблюдается, исключение составил второй вариант.

Аммонийный азот, образующийся в результате аммонификации азотсодержащих соединений, в природных условиях может потребляться растительными организмами для построения клетки или окисляться бактериями до нитритов и нитратов в процессе нитрификации. В окислении аммония всегда участвуют две группы микроорганизмов: одни окисляют аммоний, образуют нитрит, а другие окисляют нитрит в нитрат.

Нитрификация осуществляется нитрифицирующими автотрофными микроорганизмами, принадлежащими к семейству Nitrobacteriaceae.

По характеру окисляемых субстратов нитрифицирующие бактерии семейства Nitrobacteriaceae делятся на две группы: первую стадию нитрификации — окисление аммонийного азота до нитритов осуществляют бактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*; вторую стадию - окисление нитритов до нитратов - бактерии трех видов: *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*

Нитратная форма азота в отличие от аммонийного обладает высокой подвижностью, накопление ее в почве обуславливается активностью процесса нитрификации и интенсивностью потребления растениями в период вегетации. Накопление нитратного азота как продукта метаболизма микроорганизмов обуславливается уровнем плодородия почв, запасами свежего органического вещества, погодными условиями и агротехническими условиями [2].

Наиболее активно в деструкции наиболее грубой части органического вещества растительных остатков на начальных этапах принимают микромикеты и плесневые грибы. Наряду с грибами в минерализации органических остатков активно участвуют мицелиальные прокариоты — актиномикеты. По степени их развития в почве можно судить, на какой стадии минерализации находится почвенный детрит и полуразложившиеся

растительные остатки [1]. Данные по численности отдельных групп микроорганизмов в почве при разложении ПКО представлены на рис. 3.

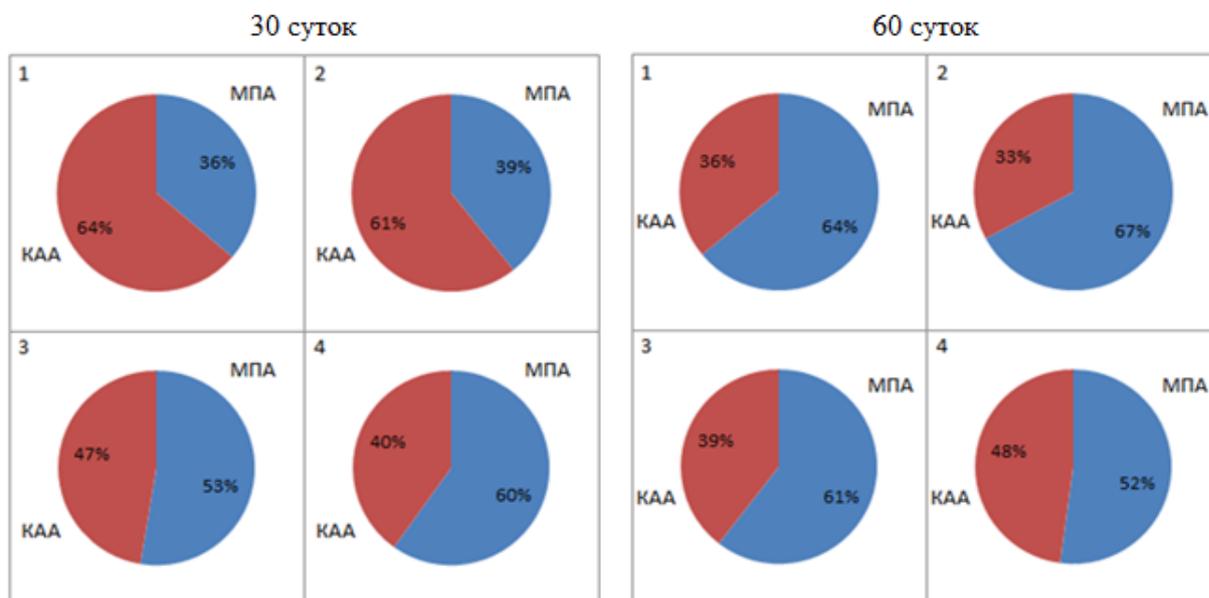


Рис. 3. Численность групп микроорганизмов в почве при разложении ПКО сельскохозяйственных культур, КОЕ / г воздушно сухой почвы за 30 и 60 суток

При закладке эксперимента количество микроорганизмов усваивающих органические формы азота, составило $1,46 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы; усваивающих минеральные формы азота – $1,62 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы, микроскопических грибов – $2,21 \cdot 10^3$ КОЕ/г почвы. Численность микроорганизмов, высеянных на МПА, в течение всего периода наблюдения изменялась в пределах десятков тысяч КОЕ/г. Численность микроорганизмов высеянных на КАА, после 30 суток была выше на порядок.

Более высокий коэффициент минерализации (КАА/МПА), отражающий интенсивность мобилизации азота, зафиксирован на вариантах с ПКО пшеницы 100 % и пшеница 75 % + горох 25 %. На последующем этапе (60 суток) произошло резкое снижение числа микроорганизмов, высеваемых на КАА, в вариантах пшеница 50 % + горох 50 % и пшеница 25 % + горох 75 % за счёт увеличения дефицита минерального азота в почве.

Вывод. Распределение микроорганизмов в почве зависит от содержания в ней органических веществ. Микроорганизмы играют важную роль в почвообразовании и плодородии почв, также участвуют в формировании почвенной структуры, образовании гумуса и других важных процессов.

Пожнивно-корневые остатки растений в современной земледелии являются важной приходной частью баланса органического вещества почвы, также корневые и пожнивные остатки бобовых культур обогащают почву азотсодержащим органическим веществом высокой биологической ценности.

Нитратный азот активно поступает в растения через коневую систему и так же быстро усваивается. Поэтому за весь период исследования было накопление нитратного азота, что обусловлено активностью процесса нитрификации и интенсивностью работы микроорганизмов. Аммонийный азот проходит долгий путь превращения в нитратную форму. Процесс разложения органических соединений проходит под действием аммонифицирующих микроорганизмов, потому наблюдалось снижение аммонийного азота.

Библиографический список

1. Батькаев Ж.Я. Роль микроорганизмов в повышении плодородия почвы // Почвоведение и агрохимия, 2013. № 2. С. 24-27.
2. Возбуцкая А.Е. Химия почв. М.: Высшая школа, 1968. 429 с.
3. Ковалевская Н.П. Особенности микробоценоза дерново-подзолистой тяжелосуглинистой почвы при длительном применении минеральных и органических удобрений // Проблемы агрохимии и экологии. 2018. № 2. С. 24-28.
4. Нурмухаметов Н.М. Солома и сидераты важные средства повышения микробиологической активности почвы // Земледелие. 2001. № 6. С. 14-16.
5. Пегова Н.А. Влияние систем основной обработки дерново-подзолистой почвы, вида пара и соломы на урожайность культур звена севооборота // Пермский аграрный вестник. 2019. № 4. С. 65-75.

О ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ, ФОРМИРУЮЩИХСЯ НА ТЕХНОГЕННЫХ ОТХОДАХ

Булавина М.И., Артамонова В.С.

ФГБУН Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Ключевые слова: биологическая рекультивация, технозёмы, фитотоксичность, азотобактер

Проблема восстановления продуктивных свойств почв на территориях, нарушенных при добыче и переработке твёрдых полезных ископаемых, стоит чрезвычайно остро. Естественное преобразование техногенных отходов до почвоподобных тел происходит медленно и мозаично. Новообразование биогенности в верхнем (корнеобитаемом) слое сдерживается негативным наследием литогенных пород и технологических реагентов, ограничивающих колонизацию растений и микроорганизмов, участвующих в формировании гумуса и биологической активности почв. В этой связи, актуальным и своевременным является изучение жизнеспособности биогенно неразвитых почв - эмбриозёмов и технозёмов, образующихся на рекультивированных (3-4 десятилетия тому назад) вскрышных породах, изъятых при угледобыче, а также на отходах агломерации железной руды. Цель представленной работы – выявить особенности биогенности молодых почв. Задачи работы включали определение фитотоксичности, содержания $C_{орг.}$, изучение встречаемости, разнообразия и роста почвообразующих бактерий.

Нами исследованы образцы молодых и зрелых почв, отобранных в Кузбассе (Литвянский угольный разрез), на КАТЭКе (Назаровский углеразрез) и в Хакасии (Черногорский углеразрез). Отходы агломераций железной руды изучены в Кузбассе на полигоне Абагурской аглофабрики (Табл 1).

Фитотоксичность определяли с использованием семян *Avena sativa* согласно нормативным требованиям [1-4]. Бактериальным объектом был представитель аэробной почвообразующей микрофлоры - *Azotobacter chroococcum* Beijerinck. Данный вид включён в состав показателей эколого-гигиенической оценки класса опасности отходов производства и потребления [2]. Для сравнения были изучены зрелые фоновые почвы чернозёмного ряда.

Использованы семена овса, приобретённые в фирме «Агрос», с действующим сроком годности. О фитотоксичности почв судили по энергии прорастания, всхожести, длине и сухой массе корней и ростков. Повторность чашек Петри с семенами (по 25 штук в каждой)

выбрана 5-кратная, поскольку в 3-х кратных вариантах проявлялся разброс данных. Почвенные образцы были отобраны в летнее время, опыт проведен в лабораторных условиях сразу после отбора почвенных проб.

Таблица 1

Объекты исследования

	Участок	Характеристика образца	№ пробы
Хвостохранилище Абагурской агломерационно-обогатительной фабрики	Контроль	Эмбриозём инициальный	1
		Эмбриозем инициальный под злаками	2
	Лесная рекультивация	Эмбриозем органо-аккумулятивный	3
		Эмбриозем органо-аккумулятивный в подлеске	4
Листвянский угольный разрез	Спланированный отвал	Эмбриозем гумусо-аккумулятивный	5
	Лесная рекультивация	Эмбриозем органо-аккумулятивный	6
Черногорский угольный разрез	Контроль	Эмбриозем инициальный	7
	Лесная рекультивация	Эмбриозем органо-аккумулятивный	8
	Фоновые почвы	Темно-каштановые	9
	Участок №1	Технозем	10
	Инициальные гребни	Эмбриозем	11
	Инициальные гребни	Эмбриозем органо-аккумулятивный	12
Назаровский угольный разрез	Инициальные гребни	Эмбриозем дерновый	13
	Фоновые почвы	Чернозем	14
	Участок №2	Эмбриозем гумусо-аккумулятивный	15
	Участок №3	Технозем	16
	Лесная рекультивация	Эмбриозем органо-аккумулятивный	17

Для выявления встречаемости и культурально-морфологического разнообразия аэробной бактерии *Azotobacter chroococcum* использовали метод обрастания комочков на безазотистой среде Эшби, представленным в отечественной и зарубежной методической литературе [5,6], а также метод чистых культур. Сообщается [7], что метод учёта бактериальных обрастаний наиболее приближен к естественным условиям обитания азотобактера. Оригинальностью и новизной нашего исследования бактерии является привлечение метода векторной графики с предварительным переносом фотоснимков с бактериальным обрастанием мелкозёмистых частиц в компьютерные программы «Corel» и «Photoshop». Они позволяют визуализировать информацию о росте бактерии на разных субстратах, обрабатывать изображения, одновременно используя операционную систему Windows, архивировать информацию. Такой инновационный подход к изучению азотобактера позволяет нам создавать визуальный контент, учитывать площадь бактериального ореола за определённый период времени, рассчитывать скорость роста бактерии, регистрировать экзометаболиты, культурально-морфологические признаки, а также сохранять фотоизображения штаммов азотобактера с люминесценцией, проявлением антагонизма по отношению к актиномицетам.

Информация о развитии азотобактера в рекультивированных техногенных отходах немногочисленна. Сведения касаются лежалых (старовозрастных) вскрышных пород,

выветренного элювия, отвальной пульпы сульфидсодержащих руд и других техногенных сред [6-10]. Выявленные в техногенных средах бактериальные штаммы мы рассматриваем как токсобные, поскольку они были жизнедеятельными в окружении экотоксикантов.

По результатам определения фитотоксичности установлено, что всхожесть опытных семян овса в контроле (на дистиллированной воде) составляла в среднем 91,2 %.

Энергия прорастания семян в биогенно неразвитых почвах различалась. Наибольшая фитотоксичность диагностировалась на железорудных отходах: в эмбриозёме инициальном (без растений) и в эмбриозёме под злаковой растительностью (Кузбасс) энергия прорастания семян не превысила 6%. Лесная рекультивация снизила токсичность среды прорастания семян в 3 раза (Табл. 2). В эмбриозёмах, формирующихся на углеотвалах (Кузбасс), энергия прорастания семян также была низкой – 7%, но на фоне лесной рекультивации достигла уровня контроля (Рис.1). В технозёмах – почвах с насыпным плодородным слоем почвы (КАТЭК и Хакассия) энергия прорастания семян овса оказалась максимальной. Что касается всхожести семян, то в эмбриозёмах на полигоне хвостохранилища она не превысила 9 %. В эмбриозёмах, формирующихся на угольных отходах, всхожесть семян достигла 88 %, а в технозёмах – 94 %, что оказалось даже чуть выше контрольного варианта (Рис.1).

Анализ морфометрических данных проростков овса в молодых почвах позволил выявить следующие тенденции. На угольном отвале Кузбасса на фоне лесной рекультивации наблюдалось удлинение корней и увеличение высоты ростков (Рис. 2).

В технозёмах КАТЭКа и Хакассии длина корней существенно превысила контрольный показатель. Суммарная длина корней и ростков овса в технозёмах была также выше, чем в других вариантах. Самой малопригодной средой для роста корней и ростков овса оказалась почвоподобная среда, формирующаяся на полигоне железорудных отходов.

Таблица 2

Морфометрические данные проростков овса

№ пробы	Средняя длина, мм		σ		v, %	
	Корень	Росток	Корень	Росток	Корень	Росток
H ₂ O	84,8	116,7	27,9	32,4	28	42
1	19,1	58,6	6,3	17,4	30	33
2	24,0	72,1	7,2	21,4	30	30
3	97,4	124,0	22,1	31,6	25	23
4	80,9	121,9	21,8	35,7	29	27
5	70,9	121,7	28,4	35	29	40
6	122,6	144,0	22,9	21,5	15	19
7	154,1	132,5	27,4	28,4	18	21
8	186,0	140,5	29,5	40,1	22	21
9	149,0	124,7	23,7	28,9	19	19
10	151,3	109,6	14,7	22,9	15	13
11	165,0	143,6	24,0	20,2	12	17
12	173,5	156,3	30,8	31,8	18	20
13	178,6	135,6	28,7	25,5	14	21
14	151,7	117,2	22,7	28,8	19	19
15	141,0	105,2	22,5	27,4	19	21
16	136,7	107,0	22,6	19,9	15	21
17	141,9	135,2	24,9	28,9	20	18

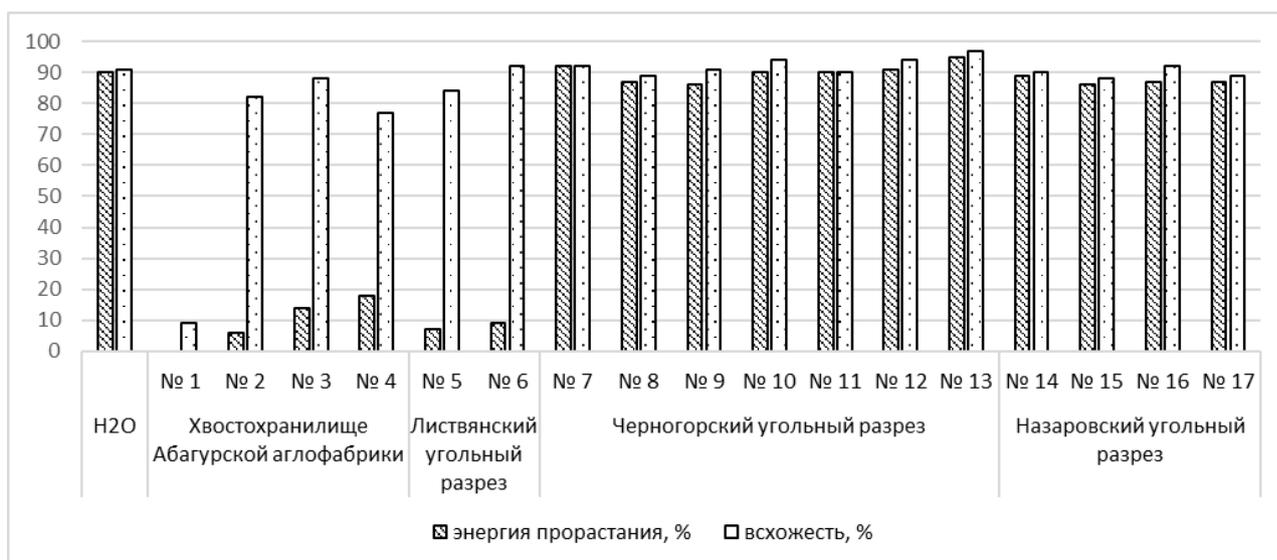


Рис. 1. Энергия прорастания и всхожесть семян овса, %.

Результаты исследований встречаемости азотобактера в эмбриозёмах и технозёмах, развивающихся на разных лежалых техногенных отходах в географически близких районах Сибири показали их жизнепригодность для азотобактера.

Однако в почвоподобных телах на железорудных отходах обрастание комочков мелкозёма было наименьшим. Выжившие бактерии сопровождалась обильным слизиобразованием и продуцированием экзопродуктов, способностью к флуоресценции, а также к подавлению роста актиномицетов (Рис. 3). Такое поведение азотобактера мы объясняем экстремальными условиями обитания и высокой конкуренцией за источники минерального и углеродного питания. В частности, в почвоподобных образованиях на железорудных отходах обнаружены аморфные агрегаты гидрооксидов железа, которые чрезвычайно трудно растворимы и, следовательно, биодоступность ионов металла была низкой. Кроме этого, гидрооксиды железа способны осаждать и сорбировать физическим и особенно хемогенным путём разные валентные формы хрома, в том числе 3-х и 6-валентные, которые чрезвычайно генотоксичны и канцерогенны. Содержание типичного литофильного элемента – Cr достигало кларка земной коры (по Виноградову), в то время как в других обследованных районах его количество было ниже: на 46% и 28% соответственно. Кроме этого, в почвоподобных образованиях на поверхности хвостохранилища обнаружено высокое содержание металлов 1-3 класса опасности: Pb, Zn, Ni, V, Mn. В некоторых пробах содержание Pb и Zn (1-й класс опасности) превышало кларковые значения в 1,4 и 1,7 раза соответственно. Не исключено, что в такой обстановке был ингибирован и синтез бактериальных сидерофоров, участвующих в поступлении и хранении минеральных элементов. Между продуцированием сидерофоров и азотфиксацией у азотобактера существует прямая корреляция (по литературным данным).

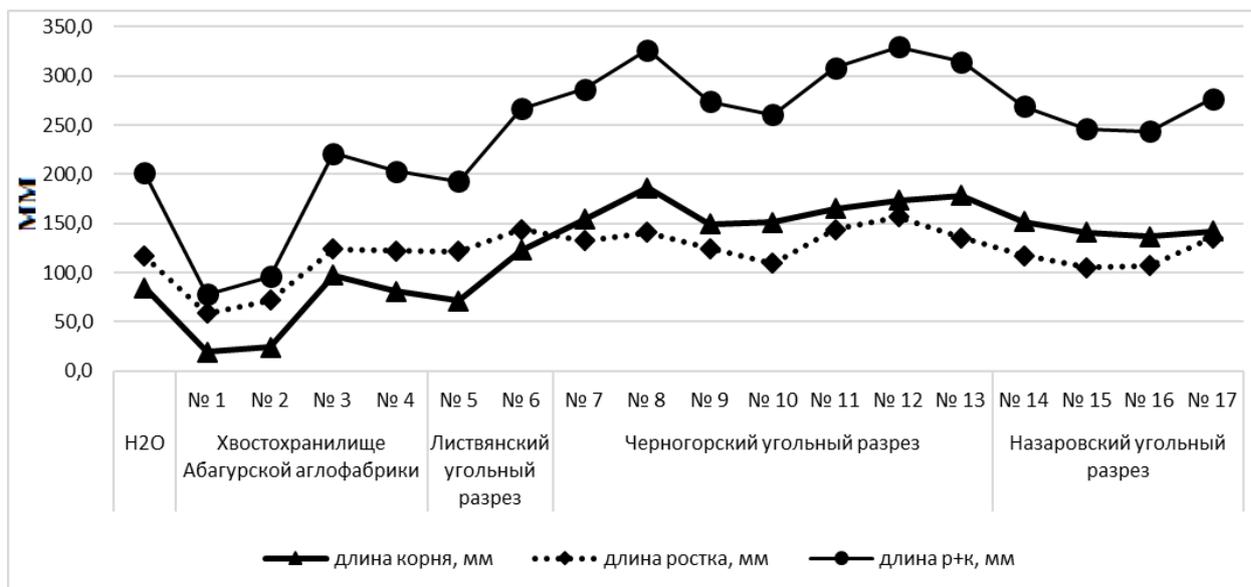


Рис. 2. Морфометрические данные проростков овса (средние показатели).

Следует отметить, что в пробах молодых почв, формирующихся на железорудных отходах, обнаружено минимальное содержание углерода. Низкие значения $S_{орг.}$ выявлены в эмбриозёмах на фоне самозараствания и при лесной рекультивации отходов: ниже 1% зарегистрированы в прикорневой зоне злаков и донника, чуть выше (1,21%) - в варианте с лесной рекультивацией. Низкое содержание $S_{орг.}$ обусловлено высокой степенью фитотоксичности техногенного субстрата, в которой участвуют также хлориды и сульфаты (Табл.3). Техногенный субстрат железорудного полигона относится к категории сильнозасолённых фитотоксичных [12].

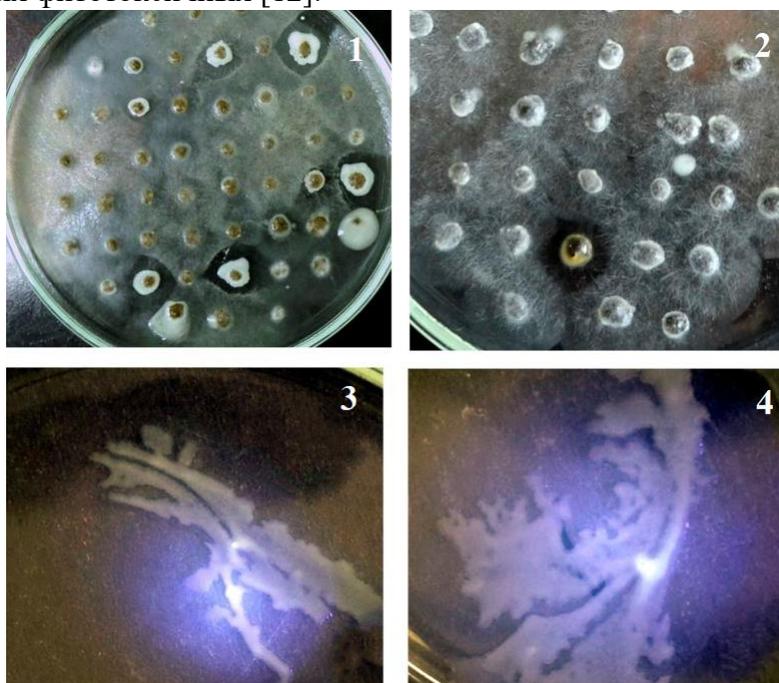


Рис. 3. Штаммы *Azotobacter chroococcum*, выделенные из эмбриозёмов шламоохранилища Абагурской аглофабрики (Кузбасс): 1, 2 – подавляющие рост актиномицетов, 3,4 – флуоресцирующие (чистая культура)

Очевидно, в такой обстановке дефицита $S_{орг.}$ и избытка экотоксикантов выживают наиболее конкурентоспособные штаммы. Это достигается проявлением

биолюминисценции и антагонизма по отношению к другим микробам. В молодых почвах Черногорского и Назаровского районов азотобактер встречался повсеместно, биолюминесценция и антимикробные свойства в отношении микромицетов и актиномицетов не выявлялись.

Таблица 3

Солевой состав водной вытяжки субстрата [11]

Плотный осадок, %	Содержание подвижной формы, мг-экв/100г							Токсичность	
	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	Ca ₂ ⁺	Mg ₂ ⁺	Na ⁺ +K ⁺	По Cl ⁻	По SO ₄ ²⁻
2,74	-	0,68	1,04	33,43	10,10	17,52	6,50	3,40	3,10

В данных условиях развитию типичных штаммов бактерии способствовало высокое содержание карбонатов и Мо, наблюдаемое как в техногенном элювии, так и в ПСП, используемой для рекультивации. Полученные сведения расширяют имеющиеся знания о токсичности техногенных отходов и экологии азотобактера.

Выводы:

Молодые почвы, формирующиеся на техногенных отходах, различаются по степени фитотоксичности и биогенности.

Наиболее жизнепригодны для фитопоселенцев и микробных колонизаторов молодые почвы, развивающиеся на отходах угледобычи.

Лесная рекультивации и привнесение насыпного плодородного слоя почв способствуют снижению токсичности молодых почв и повышению содержания C_{орг}.

Биогенное почвообразование на полигонах железорудных отходов усугубляется высокой фитотоксичностью и низкой выживаемостью азотобактерий.

В экстремальных условиях новообразования почв обитают токсобные штаммы азотобактерии, характеризующиеся способностью к флюоресценции и антагонизму.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИПА СО РАН при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, поддержана РФФИ (грант №19-29-05086 мк).

Библиографический список

1. Методические указания по проведению комплексного мониторинга плодородия почв сельскохозяйственного назначения. М., 2003. С. 82.
2. СП 2.1.7.1386-03. Почва, очистка населенных мест. Отходы производства и потребления. Определение класса опасности токсичных отходов производства и потребления. М., 2003. 15 с.
3. МР 2.1.7.2297-07. Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности. М., 2007. 9 с.
4. ГОСТ Р ИСО 22030 – 2009. Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений. М.: Стандартиформ. 2010. 28 с.
5. Бабьева И.П., Агре Н.С. Практическое руководство по биологии почв. М.: Изд-во МГУ. 1971. 140 с.
6. Сэги И. Методы почвенной микробиологии. М.: Колос, 1983. 296 с.
7. Алексеева А.Е. Физиолого-биохимическая активность и биоразнообразие штаммов *Azotobacter chroococcum*, выделенных из почв Нижегородской области: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Нижний Новгород, 2005. 24 с.
8. Артамонова В.С., Андроханов В.А., Соколов Д.А., Лютых И.В., Булгакова В. В., Бортникова С.Б., Водолеев А.С. Эколого-физиологическое разнообразие микробных сообществ в техногенно-нарушенных ландшафтах Кузбасса // Сибирский экологич. ж. 2011. Т. 5. С. 735-746.

9. Артамонова В.С., Бортникова С.Б., Оплеухин А.А. Техногенное загрязнение почв подотвальными водами в районе угледобычи // Известия Коми научного центра УрО РАН, 2016. № 4 (28). С. 38 – 45.

10. Артамонова В.С., Бортникова С.Б. О развитии *Azotobacter chroococcum* Beijerinck в старовозрастных отвалах антрацита // Теоретическая и прикладная экология, 2018. Вып.1. С. 60-72.

11. Артамонова В.С., Бортникова С.Б., Оплеухин А.А. Фитотоксичность лежалых отходов цианирования золотосодержащей руды на территории накопленного экологического ущерба // Вестник Пермского университета, 2020. Вып. 1. С. 33 – 40.

12. Feketová Z., Hulejová V., Sládkovičová B., Mangová A., Pogányová A., Šimkovic I., Krumpál M. Biological properties of extremely acidic cyanide-laced mining waste // Ecotoxicology. 2016. V. 7. No 25 (1). P. 202 - 212.

13. Водолеев А.С., Андроханов В.А., Клековкин С.Ю. Почвоулучшители: рекультивационный аспект. Новосибирск: Наука. 2007. 148 с.

14. Базилевич Н.И., Панкова Е.И. Почвы содового засоления и их мелиорация. Ереван, 1971. С.589 – 611.

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АДОНИСА ВЕСЕННЕГО В СОСТАВЕ ПАМЯТНИКОВ ПРИРОДЫ РЕГИОНАЛЬНОГО ЗНАЧЕНИЯ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПИРОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА ПОЧВЕННО-РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПОКРОВ

Вартанян Д.О., Ерзаева А.С., Рогов С.А.

ФГБОУ ВО Самарский государственный социально-педагогический университет, г. Самара, Россия.

Ключевые слова: *Adonis vernalis*, ценопопуляция, выпас, онтогенетическая структура, Самарская область

Влияние пирогенного фактора на почвенно-растительный покров природных комплексов, в том числе выделенных в качестве особо охраняемых природных территорий, изучается длительное время. Однако остаётся еще много неизученных аспектов, затрагивающих как структуру и динамику фитоценозов, сохранность почв, сукцессионные изменения структуры и численности популяций как редких, так и типичных растений, виталитет и толерантность как определенных представителей, так и природно-территориального комплекса в целом [1-9]. Актуальность имеют и исследования популяций и слагающихся видовыми популяциями фитоценозы на обширной территории, что позволяет осуществить сравнение данных между регионами.

Объектом изучения в наших исследованиях является редкий представитель флоры степной и лесостепной зон Адонис весенний (рис.). Предметом исследования послужила структура природных ценопопуляций вида. В ходе работ использовалась методика, разработанная отечественными исследователями [10-12 и др.].

В Самарской области популяции адониса изучаются нашим научным руководителем, к.б.н., доцентов СГСПУ В.Н. Ильиной [2, 3, 5, 8 и др.]. Нами осуществлялся мониторинг ранее необследованных ценопопуляций.

Онтогенетический состав ценопопуляций в указанных группах представлен в таблице. Во всех изученных ценопопуляциях *Adonis vernalis* доминирующей фракцией особей является генеративная. Примерно одинаковой остается доля имматурных,

виргинильных и молодых генеративных и субсенильных особей. После пожаров снижается эффективность возобновления в ценопопуляциях, что связано с уничтожением проростков в связи с их высокой уязвимостью, а также вероятным уничтожением семян растения на почве. В онтогенетических спектрах меняется соотношение зрелых и старых генеративных особей. Хотя этот процесс перехода в более позднее онтогенетическое состояние обратим при снижении пирогенной нагрузки (в случае, когда пожары редки и не повторяются на одной и той же территории), но для конкретных сезонов наблюдений это приводит к более низкой семенной продуктивности отдельных особей. Следовательно, в последующие сезоны для ценопопуляций свойственна более низкая интенсивность возобновления. Повторяющиеся пожары приводят к постепенному старению ценопопуляций и уменьшению ее потенциала к возобновлению.



Рис. Адонис весенний, зрелая генеративная особь (фото В.Н. Ильиной)

Таблица

Онтогенетический состав ценопопуляций

Онтогене- тическая группа	Номер ценопопуляции							Усредненный спектр		
	1	2	3*	4*	5*	6*	7*	по всем ЦП	до пожара	после пожара
p	3,1	1,7	0	0	0	0	0	0,7	2,4	0
j	4,4	2,9	0	2,4	0	0	0	1,4	3,7	0,5
im	6,7	7,1	3,2	6,8	14,3	2,9	6,8	6,8	6,9	6,8
v	12,9	5,9	8,9	18,5	12,7	6,2	3,6	9,8	9,4	10,0
g1	8,6	16,8	18,4	26,6	19,1	15,2	11,4	16,6	12,7	18,1
g2	49,0	44,2	38,2	10,7	19,7	24,9	51,9	34,1	46,6	29,1
g3	13,9	16,8	29,6	33,8	34,2	43,3	23,6	27,9	15,3	32,9
ss	1,4	2,9	1,7	1,2	0	7,5	2,7	2,5	2,2	2,6
s	0	1,7	0	0	0	0	0	0,2	0,9	0

Примечание: * - ценопопуляции после огневого воздействия; 1,3, 4, 5 – Каменный овраг; 2, 6, 7 – Овраг Верховой

В изученных пунктах (памятники природы регионального значения Самарской области «Каменный овраг», «Овраг Верховой») необходимо осуществление мероприятий по сокращению пожаров, которые зачастую возникают по вине рекреантов.

Таким образом, подтверждается факт старения ценопопуляций адониса при возникающих степных пожарах несмотря на то, что взрослые особи практически не страдают при беглых палах. Однако снижение виталитета и уничтожение семян и особей начальных стадий онтогенеза постепенно приводит популяции к выпадению из травостоя.

Библиографический список

1. Ильина В.Н. Пирогенное воздействие на растительный покров // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2011. – Т. 20, № 2. С. 4-30.

2. Ильина В.Н. Изменения базовых онтогенетических спектров популяций некоторых редких видов растений Самарской области при антропогенной нагрузке на местообитания // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2015. – Т. 24. № 3. – С. 144-170.

3. Ильина В.Н. Эколого-биологические особенности некоторых редких видов растений степной флоры при выпасе и палах // Ботанический вестник Северного Кавказа. – 2017. – № 2. – С. 12-22.

4. Ильина В.Н. Онтогенетическая структура ценопопуляций *Polygala sibirica* L. (*Polygalaceae*) в местообитаниях с различной степенью антропогенного воздействия // Известия Коми научного центра УрО РАН. – 2018. – № 1(33). – С. 28-35.

5. Ильина В.Н. Демографическая структура ценопопуляций адониса весеннего (*Adonantha vernalis* (L.) Spach) в Самарском Высоком Заволжье // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2019. – Т. 28. – № 3. – С. 205-210. DOI 10.24411/2073-1035-20189-10256

6. Ильина В.Н. Онтогенетическая структура ценопопуляций *Medicago cancellata* Vieb. (*Fabaceae*) в местообитаниях с различной степенью антропогенной нагрузки // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. 2019. – Т. 28. – № 3. – С. 200-204. DOI 10.24411/2073-1035-2019-10255

7. Ильина В.Н. О роли квазисенильных особей в составе ценопопуляций редких растений-кальцефитов // Академический вестник ЭЛПИТ. – 2020. – Том 5. – №1(11). – С. 30-40.

8. Ильина В.Н., Саксонов С.В. Некоторые итоги изучения ценопопуляций адонисов весеннего и волжского (*Adonis vernalis* L. и *A. wolgensis* Stev.) в бассейне Средней Волги // Бюл. Главного ботанического сада. – 2010. – Вып. 196. – С. 107-116.

9. Маркелова А.А. Влияние нефти, пирогенного воздействия и пенообразователей на зеленые растения и верхний слой почвы // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2012. – № 33. – С. 93-96.

10. Османова Г.О., Животовский Л.А. Онтогенетический спектр как индикатор состояния ценопопуляций растений // Известия РАН. Серия биологическая. – 2020. – № 2. – С. 144–152.

11. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Труды БИН АН СССР. Сер. 3. Геоботаника. – М.: АН СССР, 1950. Вып. 6. – С. 7-204.

12. Уранов А.А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функция времени и энергетических волновых процессов // Биол. науки. – 1975. – № 2. – С. 7-34.

ОЛИГОХЕТОЦЕНОЗЫ РЕКИ ОЧЁР

Власов С.В.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
г. Пермь, Россия

Ключевые слова: олигохеты, олигохетоценозы, Очёр

Река Очёр — типичная равнинная река, является одним из крупных правобережных притоков Воткинского водохранилища. Длина реки составляет 82 км, площадь водосбора — 1210 км² [9].

Сведения по олигохетам в составе зообентоценозов реки содержатся в работах [1,2,3]. Для выявления состояния донной фауны олигохет нами проведена гидробиологическая съемка р. Очёр. Отбор количественных гидробиологических проб проводился в полевой сезон 2016 г по унифицированному методу [4] при помощи гидробиологического скребка шириной 15 см. Пробы собирали на пяти станциях, расположенных в верхнем (№ 1 — близ д. Киприно), среднем (№ 2 и 3 — в черте г. Очёр, № 4 — близ д. Грязново) и нижнем (№ 5 — близ с. Острожка) течении реки. При выборе станций учитывали тип грунта, наличие заиления, детрита и высшей водной растительности. Всего собрано 26 проб. Идентификация олигохет проводилась по определителям и отдельным статьям [5,6,7,8]. При составлении фаунистических списков олигохет придерживались системы, принятой в определителе Т. Тимма [7] и определителе зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России [5].

По оригинальным данным олигохетофауна р. Очёр насчитывает 29 видов (табл. 1). Впервые для бассейна верхней и средней Камы указываются *Potamothrix vej dovskyi*, *Tubifex ignotus*, *Lumbricillus lineatus*, *Mesenchytraeus armatus*, *Marionina riparia*, *Cognettia cognettii* и *Dendrodrilus rubidus*.

В биотопах р. Очёр формируются олигохетоценозы, различающиеся по видовому разнообразию и с неодинаковыми показателями численности и биомассы. Только на гравийно-галечниковом грунте верхнего течения отмечены *Pristina rosea* и *Nais pardalis*. Виды *Aulodrilus pluriseta*, *Ilyodrilus templetoni*, *Potamothrix vej dovskyi*, *Tubifex ignotus*, *Nais bretscheri*, *Nais elinguis*, *Spirosperma ferox* зарегистрированы лишь на заиленном гравийно-песчаном грунте среди зарослей элодеи. Виды *Marionina riparia*, *Cognettia cognettii* и *Limnodrilus profundicola* были встречены только на песчаном грунте близ д. Грязново, а *Nais behningi* обнаружен только в нижнем течении на гравийно-песчаном биотопе. Общими для биотопов среднего и нижнего течения оказались виды *Stylaria lacustris*, *Lumbriculus variegatus*, *Tubifex newaensis*. Виды *Limnodrilus claparedianus*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Tubifex tubifex* отмечены на всех исследованных биотопах.

Наибольшим таксономическим разнообразием характеризуется олигохетоценоз заиленного гравийно-песчаного биотопа с зарослями элодеи среднего течения (16 видов), наименьшим — олигохетоценоз гравийно-галечникового биотопа верхнего течения (7 видов). Как известно, состав, распределение и численность олигохет зависят в основном от характера грунта. Наиболее продуктивны в этом отношении заиленные пески и илы, что мы и наблюдаем на станции 2.

Доминантный комплекс верхнего течения реки складывается из олигохет *Limnodrilus* sp. Среди заиленного гравийно-песчаного биотопа с зарослями элодеи доминируют *Nais bretscheri*, *Stylaria lacustris*, *Limnodrilus hoffmeisteri* и *Tubifex tubifex*. В гравийно-песчаном биотопе — *Stylodrilus heringianus*. На песчаном грунте доминирует *Limnodrilus* sp. и

Propappus volki. В нижнем течении преобладающим видом оказался *Limnodrilus claparedianus*.

Таблица 1

Видовой состав и распределение олигохет по станциям реки Очёр в 2016 году*

Таксон	1	2	3	4	5
сем. Naididae Ehrenberg, 1828					
1. <i>Nais behningi</i> Michaelsen, 1923					+
2. <i>N. bretscheri</i> Michaelsen, 1899		+			
3. <i>N. communis</i> Piguët, 1906		+			
4. <i>N. elinguis</i> Müller, 1774		+			
5. <i>N. pardalis</i> Piguët, 1906	+				
6. <i>Stylaria lacustris</i> (Linnaeus, 1767)		+	+	+	+
сем. Pristinidae Lastočkin, 1924					
7. <i>Pristina rosea</i> (Piguët, 1906)	+				
сем. Tubificidae Vejdovský, 1884					
8. <i>Aulodrilus limnobius</i> Bretscher, 1899	+	+			
9. <i>A. pluriseta</i> (Piguët, 1906)		+			
10. <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparède, 1862	+	+		+	
11. <i>L. claparedianus</i> Ratzel, 1868	+	+		+	+
12. <i>L. profundicola</i> (Verrill, 1871)				+	
13. <i>Tubifex tubifex</i> (Müller, 1774)	+	+	+	+	+
14. <i>T. newaensis</i> (Michaelsen, 1903)				+	+
15. <i>T. ignotus</i> (Stolc, 1886)		+			
16. <i>Potamothrix vejdoskyi</i> (Hrabe, 1941)		+			
17. <i>Spirosperma ferox</i> Eisen, 1879		+			
18. <i>Ilyodrilus templetoni</i> (Southern, 1909)		+			
сем. Propappidae Coates, 1986					
19. <i>Propappus volki</i> Michaelsen, 1916	+			+	
сем. Lumbriculidae Vejdovský, 1884					
20. <i>Lumbriculus variegatus</i> (Müller, 1774)		+	+	+	+
21. <i>Stylodrilus heringianus</i> Claparède, 1862		+	+		
сем. Lumbricidae Claus, 1876					
22. <i>Dendrodrilus rubidus</i> (Savigny, 1826)			+		
23. <i>Eiseniella tetraedra</i> (Savigny, 1826)			+		
сем. Enchytraeidae Vejdovský, 1879					
24. <i>Cognettia cognettii</i> (Issel, 1905)				+	
25. <i>Enchytraeus albidus</i> Henle, 1837		+		+	
26. <i>Lumbricillus lineatus</i> (Müller, 1774)			+		
27. <i>Lumbricillus</i> sp.					+
28. <i>Marionina riparia</i> Bretscher, 1899				+	
29. <i>Mesenchytraeus armatus</i> (Levinsen, 1884)			+		

Примечание: *1 – станция 1; 2 – станция 2; 3 – станция 3; 4 – станция 4; 5 – станция 5.

Наибольшая численность отмечена в сообществе олигохет на заиленном гравийно-песчаном грунте среди зарослей элодеи (3813 экз/м²). Высокие показатели биомассы характерны для олигохетоценоза песчаного биотопа близ д. Грязново (3,750 г/м²). Наименьшие показатели как численности, так и биомассы отмечены для олигохетоценоза гравийно-галечникового биотопа верхнего течения реки (25 экз/м² и 0,026 г/м² соответственно).

Библиографический список

1. Боброва О.А. Сезонная динамика бентоса реки Очёр Пермской области // Учёные записки Пермского государственного университета. Пермь, 1969. Т. 179. С. 198-212.
2. Боброва О.А. Донная фауна малых рек Очера и Бабки// Материалы итоговой научной конференции зоологов Волжско-Камского края. Казань, 1970. С. 315-321.
3. Кузнецова В.И., Зенкова Н.И., Костарева Н.П. Гидробиологический очерк реки Очера // Изв. ест.-науч. ин-та при Пермском ун-те. 1959. Т. 14. Вып. 3. С. 85 – 95.
4. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов / Под. ред. Ф.Д. Мордухай-Болтовского. — М.: Наука, 1975. — 239 с.
5. Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 2. Зообентос / под.ред. В.Р. Алексеева и С.Я. Цалолыхина. М.-СПб.: Товарищ.науч. изд. КМК, 2016. 457 с.
6. Чекановская О.В. Водные малоцетинковые черви фауны СССР. М.-Л.: из-во АН СССР, 1962. 411 с.
7. Timm T. A guide to the freshwater Oligochaeta and Polychaeta of Northern and Central Europe. Lauterbornia, 2009. V. 66.P. 1–235.
8. Schmelz R.M. & R. Collado A guide to European terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta). Soil organisms, 2010. V. 82.P. 1–176.
9. <http://textual.ru/gvr/>

ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТИМУЛЯТОРОВ КОРНЕВОГО РОСТА ПРИ ВЕГЕТАТИВНОМ РАЗМНОЖЕНИИ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО

Галанов А.Э., Моисеева К.В.

ФГБОУ ВО Государственный аграрный университет Северного Зауралья, Тюмень, Россия

Ключевые слова: стимуляторы роста, размножение, укореняемость, можжевельник обыкновенный.

Размножение Можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.) происходит как семенным, так и вегетативным путем. В литературе имеются работы о преобладании одного из них и объясняется это различными экологическими условиями. Некоторые авторы отмечают в природных ценозах преобладание семенного размножения [1,2,3]. Тем не менее, вегетативное размножение характерно для влажных типов лесов, где происходит укоренение приземных ветвей под благоприятным моховым покровом. Длительный период покоя семян, особые условия их прорастания, значительный процент пустозернистых семян, зараженность их вредителями создают трудности при семенном размножении и в природной среде, и при искусственном выращивании сеянцев.

Учитывая трудности семенного возобновления можжевельника, предпочтение отдается вегетативному способу размножения. Использование его позволяет получить укорененные черенки достаточно хорошего качества более быстрым путем. Кроме того, указанный посадочный материал наследует признаки маточного растения, отличается

более высокими биометрическими показателями надземной и подземной части, по сравнению с сеянцами [3,4].

Эффективным способом размножения можжевельника считается черенкование. Укореняемость зависит от вида, срока черенкования, типа черенков. При этом можжевельник обыкновенный отличается высокой способностью к укоренению.

Многие ученые, занимавшиеся изучением форм Можжевельника обыкновенного на Урале и в Сибири, в результате проведенных исследований, обнаружили существенную зависимость морфологических форм можжевельника от условий природной среды [5,6,7,8,12].

Характеризуя можжевельник обыкновенный, авторы отмечают его светолюбивость, засухоустойчивость, морозостойкость, нетребовательность этого вида к почвенным условиям. Однако из-за низкой конкурентоспособности он вынужден занимать участки, свободные от других растений: бедные песчаные, каменистые и известняковые почвы. Можжевельники единогласно заносятся в список долговечных видов, представляющих значительные перспективы для дендрохронологических и дендроклиматологических исследований [9,10,11].

В данной работе мы использовали метод черенкования. Черенки собраны нами в северной лесостепи Тюменской области, в количестве 27 шт. с одного 10-летнего растения 31 марта 2019 года.

В опыте использовали 9 вариантов: «Контроль», «Корневин», «Гетероауксин», «Корень Супер», «КорнеСил», «Фитозонт», «Эпин-Экстра», «Циркон», «Био-Микориза». В каждом варианте изучалось по 3 черенка.

Температура воды для черенков 22-25°C. Добавление воды в емкости происходило в разное время для каждого препарата – по мере необходимости, – так как потребление воды одними черенками превышало потребление других. В основном добавление воды происходило один раз в 3 суток.

Черенки можжевельника были прикрыты от солнечного света, чтобы стимулировать тем самым скорость корневого роста. Так, солнечный свет поступал на них в течение 30-60 минут один раз в сутки.

Согласно исследованиям В.П. Путенихина, Р.В. Вафина, Р.Г. Абдуллиной и др. на укоренение Можжевельника обыкновенного уходит от 50 до 90 суток, ожидаемый результат укореняемости 60,6% [12].

В нашем опыте на 41 сутки отмечено отмирание черенков в варианте с препаратом «Корень Супер», на 42-е сутки черенки были высажены в почву.

Для можжевельника обыкновенного была использована почва с кислотностью pH 5,5-6,5, в котором содержание органического вещества не менее 70%.

По результатам опыта на 15 июня 2019 года мы отметили 100% укореняемость в варианте с препаратом «Фитозонт», в варианте с водой (контроль) выживаемость составила 66,7%. В вариантах с препаратами: «Корневин», «КорнеСил», «Эпин-Экстра» и «Био-Микориза» укореняемость составила 33,3%. У остальных вариантов укореняемость составила в нашем опыте 0%.

Проанализировав результаты опыта, мы пришли к выводу о проведении опыта с выделившимися препаратами: «Корневин», «КорнеСил», «Эпин-Экстра», «Био-Микориза» и контроль. Было собрано еще 15 черенков с зелеными уже сформированными шишкоягодами, тогда как в первом опыте шишкоягоды сформировались по ходу опыта.

11 июня 2019 года черенки были посажены в почву. На 34-е сутки из 15 черенков выжило 11, погибло 4 черенка.

В результате проведенных исследований наибольшая эффективность в укоренении черенков можжевельника обыкновенного отмечена в варианте с препаратом «КорнеСил», с эффективностью 100%. В остальных изучаемых вариантах опыта укореняемость составила на уровне контроля (вода) – 66,7% (рис. 1).

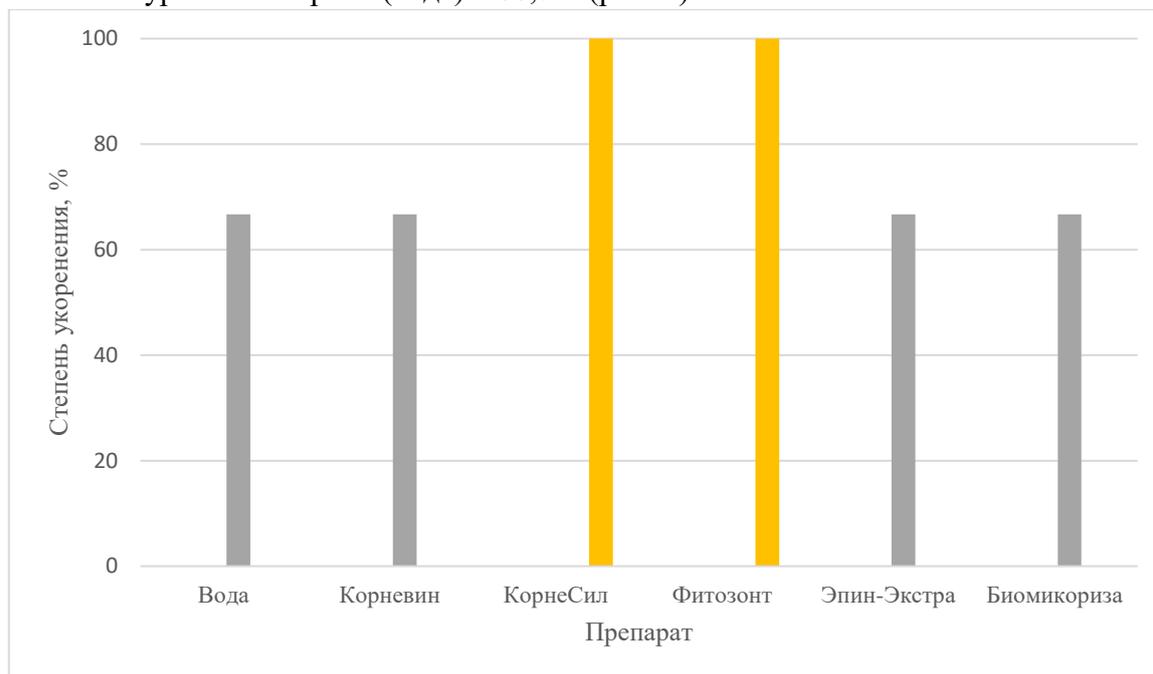


Рис. 1 – Влияние препаратов на степень укоренения черенков Можжевельника обыкновенного, 2019 г.

Исходя из результатов наших опытов, можно сделать вывод, что наибольший процент укоренения черенков Можжевельника обыкновенного отмечено в вариантах с препаратами «Фитозонт» и «КорнеСил» – 100%. В остальных изучаемых вариантах степень укоренения составила 67,7%. В опытах с марта по июнь прослеживается увеличение степени укоренения с 33,3% до 66,7%, что подтверждается работами других авторов [13], где процент укореняемости при обработке препаратом «Эпин-Экстра» может расти и колебаться на уровне 85%.

Библиографический список

1. Матвеева Р.Н, Буторова О.Ф. Черенкование хвойных видов в условиях Сибири: монография / Красноярск: СибТГУ, 2004. – 368 с.
2. Хессайон Д.Г., Филин В.Р. Все о декоративных деревьях и кустарниках / М.: Кладезь-Букс, 2015. – 128 с.
3. Тишкина Е.А. Закономерности распространения, формовое разнообразие и экологическая приуроченность *Juniperus communis* L. на Урале: дис. ... канд. с.-х. наук. Екатеринбург, 2009.
4. Моисеева К.В., Слущанова Е.Д. Вегетативное размножение Туи западной *Thuja occidentalis* L. в сб. Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам. Сб. науч. тр. по результатам работы IV Международной молодежной научно-практической конференции. – 2019. – С. 296-299.
5. Михеева Н.А. Морфолого-анатомические и кариологические особенности Можжевельника обыкновенного (*Juniperus Communis* L.) в гидроморфных и суходольных условиях произрастания: дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 2005.
6. Хантемирова Е.В., Семериков В.Л. Аллозимный полиморфизм разновидностей можжевельника обыкновенного // Лесоведение. 2009. – Т.46. – №1. – С. 74-77.

7. Хантемирова Е.В., Семериков В.Л. Генетическая изменчивость некоторых разновидностей можжевельника обыкновенного по аллозимным локусам // Генетика. – 2010. – Т.46. – № 5. – С.1-9.

8. Кожевников А.П., Тишкина Е.А., Годовалов Г.А. Экологические особенности Можжевельника обыкновенного в южных и северных районах Свердловской области // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2010. – Т.3. – № 27. – С. 46-50.

9. Алпатова А.В, Игнатова Г.А. Влияние стимуляторов корнеобразования на декоративные культуры // Russian Agricultural Science Review. 2015. – Т.5. – №51. – С. 58-61.

10. Мосякина О.И., Лексокова В.В. Стимуляторы корнеобразования и регуляторы роста растений // Сетевой научный журнал ОрелГАУ. 2016. – Т1. – №1. – С. 94-97.

11. Харламова С.В. Размножение можжевельника обыкновенного в республике Марий Эл: дис. ... канд. с.-х. наук. Йошкар-Ола, 1997.

12. Путенихин В.П., Вафин Р.В., Абдуллина Р.Г., Никитина Л.С., Полякова Н.В., Рязанова Н.А., Фарукшина Г.Г. Разработка технологии много ступенчатого вегетативного размножения трудноукореняемых древесных растений // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011. – Т.13. – №5. – С. 83-86.

13. Панюшкина Н.В., Карасева М.А. Стимуляция корнеобразования перспективных интродуцентов // Актуальные проблемы лесного комплекса. 2007. – Т.1. – №17. – С. 205-207.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Гизатуллина Ю.С.¹, Ваньков Н.В.², Головкова А.А.³, Степанова О.А.³, Ремезовская Н.Б.¹

¹ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

²ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, Пермь, Россия.

³ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Представители вида *Escherichia coli*, обитающие в нижней части кишечника животных и человека, выполняют защитную функцию за счет конкуренции с патогенными микроорганизмами за питательные вещества и рецепторы в желудочно-кишечном тракте, а также продуцируя разнообразные бактериоцины. Эти бактерии могут быть как комменсалами, существующими в симбиотическом состоянии с хозяином, вызывая заболевания внекишечных биотопов только при транслокации, так и этиопатогенами кишечных инфекций – эшерихиозов [1, 2].

В последние годы очень остро стоит вопрос об увеличении уровня устойчивости к антимикробным препаратам среди условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. В животноводстве и птицеводстве антибиотики используются в качестве стимуляторов роста, для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, а также для увеличения срока хранения готовой продукции [3]. Широкое использование данных препаратов в сельском хозяйстве способствует появлению и распространению антибиотикоустойчивости среди комменсальной микробиоты продуктивных животных, которая становится «депо генов

резистентности» для патогенных микроорганизмов – возбудителей антропозоонозов [4]. В Бельгии группа Chantziaras и соавт. (2013) провела ретроспективный анализ отчётов из семи стран Европы по объёмам применения ветеринарных антимикробных средств и распространённости резистентных изолятов *E. coli*, выделяемых от животных. Авторами было показано наличие чёткой корреляции между ростом применения антимикробных средств в животноводстве и увеличением антимикробной резистентности бактерий [5]. Согласно результатам анализа исследователей из университета Принстона, в период с 2000 по 2018 гг. в развивающихся странах количество антибиотиков, устойчивость к которым превышает 50% микробной популяции, увеличилось в 2,5 раза [6].

Результаты многочисленных исследований показывают, что резистентные штаммы бактерий могут распространяться за пределы животноводческих хозяйств. Выход антибиотикоустойчивых микроорганизмов в окружающую среду через отходы животного происхождения увеличивает «резервуар сопротивления», существующий в микробиоме природных биотопов, что является угрозой здоровью населения [7]. Этому процессу также способствует микробная коммуникация и горизонтальный перенос генов антибиотикорезистентности путем конъюгации и трансдукции [8]. Так, например, немецкими исследователями показано, что 3,4% выделенных от людей штаммов метициллин-резистентных стафилококков имели «животное» происхождение [9]. В данном аспекте изучение факторов патогенности, антагонистических свойств и антибиотикоустойчивости бактерий *E. coli*, изолированных из различных источников, представляет не только научный, но и практический интерес.

Цель работы – охарактеризовать биологические свойства штаммов *E. coli*, выделенных от сельскохозяйственных животных.

Методы и материалы. В работе были использованы изоляты *E. coli* (n=58) из фекалий здоровых животных частных фермерских хозяйств и предприятий промышленного животноводства Пермского края. Все культуры были проверены на генетическую уникальность с помощью гер-ПЦР с праймерами ERIC1/2 (5'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA/5'-AAGTAAGTGA CTGGGGTGAGCG), в дальнейшую работу были взяты только индивидуальные штаммы (n=37; изоляты от коров – 14, кроликов – 4, свиней – 3, перепелов – 7, индюков – 3, куриц – 6).

Биоплёнкообразование оценивали по показателю оптической плотности (ОП₅₇₀) спиртовых растворов 0,1% генцианового фиолетового, согласно Merritt J.H. et al. [10]. Гемолитическую активность определяли на кровяном агаре стандартным методом. Устойчивость к бактериоцину ColE7 и бактериоциногению проверяли методом отсроченного антагонизма в технике двойного слоя [11], наличие бактериофага определяли с помощью метода индукции УФ-излучением, все тесты проводили с использованием контрольного штамма *E. coli* DH5α. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом (МАКМАХ, версия-2018-03).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы STATISTICA v.10. Для выявления статистически значимых различий определяли критерий Стьюдента (*t*-test), для оценки силы связи использовали коэффициент Пирсона (*r*). Все результаты оценивали при уровне достоверности $p < 0,05$.

Результаты. Изученные *E. coli* имели большой размах показателя биомассы биопленок, который варьировал от 0,124 до 1,875 ед. ОП. Наибольшей биопленкообразующей способностью обладали штаммы, выделенные от свиней, для которых биомасса биопленки в среднем составила $1,820 \pm 0,079$ ед. ОП, что достоверно отличалось от других групп животных (*t*-test: $p < 0,05$). Следующие по массивности биопленки образовывали эшерихии, выделенные от индюков ($0,565 \pm 0,483$ ед. ОП). В

группах штаммов от кроликов, коров и куриц биомасса биопленок была примерно одинаковой, а для перепелов оказалась наименьшей из всей выборки ($0,297 \pm 0,142$ ед. ОП). Гемолитической активностью обладали только два штамма *E. coli*, по одному от куриц и коров. Двадцать семь штаммов (72,9%) были инфицированы лизогенным бактериофагом, четыре культуры (10,8%) продуцировали бактериоцины. Следует отметить, что все эшерихии, изолированные от животных, обладали резистентностью к колицину ColE7.

Семнадцать штаммов (45,9%) были устойчивы хотя бы к одному антибактериальному препарату, 32,4 % – к двум и более, а один штамм был устойчив сразу к семи исследованным агентам. «Животные» *E. coli* чаще были нечувствительны к бета-лактамам, ампициллину (35,1% штаммов) и амоксициллину (27% штаммов), которые широко применяются в сельском хозяйстве для профилактики и лечения кишечных инфекций, а также к левомецетину (18,9%), в то время как к ципрофлоксацину, левофлоксацину и гентамицину устойчивость в данной выборке не была обнаружена. Сравнение между группами животных показало, что антибиотикорезистентность чаще встречалась среди *E. coli*, выделенных от коров (78,6%), реже – куриц (50%) и перепелов (42,9%), а у кроликов, свиней и индюков устойчивые штаммы обнаружены не были.

Антибактериальные препараты широко используются на предприятиях сельского хозяйства для профилактики инфекционных заболеваний с целью сохранения численности поголовья. В частных хозяйствах, где плотность животных существенно ниже, фермеры стараются отказываться от использования антибиотиков в качестве кормовой добавки, используя их только в лечебных целях. Сравнительный анализ биологических свойств *E. coli*, изолированных от «промышленных» и «частных» животных, показал, что, действительно, на сельскохозяйственных предприятиях процент штаммов с устойчивостью хотя бы к одному антибиотику был выше, чем в частных хозяйствах (рис.). Кроме того, культуры из первой группы чаще были инфицированы лизогенным бактериофагом, что может способствовать распространению детерминант устойчивости к антибиотикам. Ранее проведенное исследование профиля антибиотикоустойчивости среди птичьих *E. coli*, выделенных на крупных птицефабриках от цыплят-бройлеров с системным колибактериозом, выявило высокий уровень устойчивости штаммов к большому спектру препаратов, особенно к бета-лактамам (к ампициллину – 82,1%, цефотаксиму – 42,9%, цефтазидиму – 39,3%), и почти треть имели мобильные генетические элементы [12]. Интересно, что *E. coli* от фермерских животных, в среднем, образовывали более массивные биопленки, что косвенно может быть объяснено отсутствием антибиотиков в рационе. Биопленка в кишечнике играет важную роль колонизационного барьера, обеспечивая защиту от адгезии патогенных микроорганизмов. Постоянное применение антибиотиков для элиминации возбудителей инфекции, возможно, опосредовано влияет на защитные функции бактериального сообщества в отсутствие антагонистического давления. Также непосредственно сами антибиотики, как химические агенты, могут подавлять физиологические процессы бактериальных клеток, например, известно, что азитромицин ингибирует синтез экзополисахаридов *P. aeruginosa* [13].

Заключение. Штаммы *E. coli*, выделенные от различных сельскохозяйственных животных, демонстрируют разнообразие биологических характеристик. Наиболее переменными признаками в изученной выборке были биопленкообразующая способность и чувствительность к антибактериальным препаратам. Показано, что для некоторых групп животных доля устойчивых штаммов может превышать 50%. Проблема накопления антибиотикорезистентности осложняется возможностью распространения детерминант устойчивости внутри микробной популяции и за ее пределы. Высокая частота инфицированности животных штаммов лизогенным бактериофагом может стать фактором

риска передачи генов антибиотикоустойчивости и других маркеров вирулентности горизонтальным путем. Кроме того, предварительные эксперименты по конъюгативному переносу производной F-плазмиды (данные не опубликованы) показали, что *E. coli*, выделенные от различных животных, могут эффективно выступать как в роли реципиентов, так и доноров маркеров резистентности. Данные результаты свидетельствуют о селекции и циркуляции гетерогенных экочаев *E. coli* с измененными адаптивными свойствами среди животных, которые могут представлять потенциальную эпидемическую опасность на предприятиях сельского хозяйства.

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

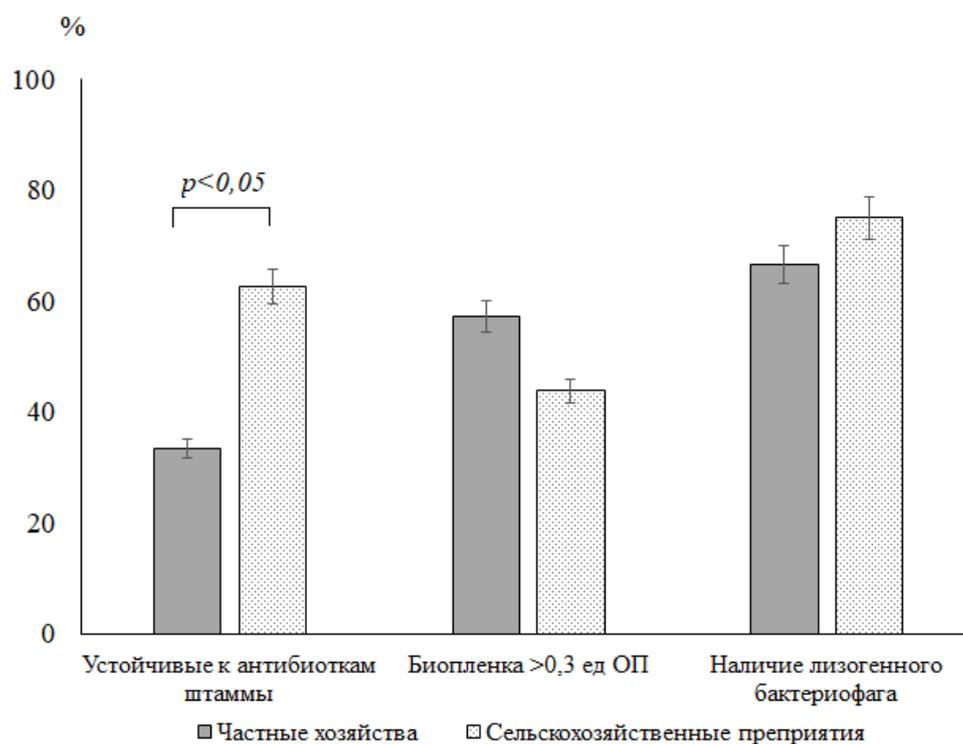


Рис. Доли устойчивых к антибиотикам, высокобиопленкообразующих и лизогенных культур в популяциях штаммов *E. coli*, изолированных в животноводческих хозяйствах разных категорий.

Библиографический список

- Шахов А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Ветеринарный консультант. – 2003. – № 1. – С. 4-5.
- Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections // Iran J. Microbiol. – 2010. – V. 2(2). – P. 59-72.
- Симджи Ш., Дул Р., Козлов Р.С. Рациональное применение антибиотиков в животноводстве и ветеринарии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18, № 3. – С. 186-190.
- Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential // Public. Health. Rep. – 2012. – V. 127. – P. 4-22.
- Chantziaras I., Boyen F., Callens B., Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries // J. Antimicrob. Chemother. – 2014. – V. 69(3). – P. 827-834.
- Van Boeckel T.P., Pires J., Silvester R., Zhao C., Song J., Criscuolo N.G., Gilbert M., Bonhoeffer S., Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries // Science. – 2019. – V. 365(6459).

7. Короткевич Ю.В. Анализ резистентности к антибиотикам энтеробактерий и энтерококков, выделяемых из пищевых продуктов // Вопросы питания. – 2016. – № 2. – С. 5-13.
8. Economou V., Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria // Infect. Drug Resist. – 2015. – V. 8. – P. 49-61.
9. Bernd-Alois Tenhagen. AMR in the food chain in Germany - the one health aspect. Tenhagen, Prague, 18.11.2015.
10. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilm // Curr. Protoc. Microbiol. – 2005. [Electronic resource]: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568995>
11. Budič M., Rijavec M., Petkovšek Ž., Žgur-Bertok D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. PLoS One. – 2011. – V.6.
12. Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S., Nesterova L.Y., Starcic Erjavec M. *Escherichia coli* Isolated from Cases of Colibacillosis in Russian Poultry Farms (Perm Krai): Sensitivity to Antibiotics and Bacteriocins // Microorganisms. – 2020. – V. 8(741).
13. Nalca Y., Jänsch L., Bredenbruch F., Geffers R., Buer J., Häussler S.,. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – V. 50(5). – P. 1680-1688.

ЗНАЧЕНИЕ МЕЛАТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ НК-КЛЕТОК

Глебездина Н.С.

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

Ключевые слова: мелатонин, НК-клетки, цитокины, врожденный иммунитет.

Гормон индоламинового типа мелатонин является основным продуктом, синтезируемым и секретируемым шишковидной железой из серотонина под действием ферментов N-ацетилтрансферазы и гидроксиндол-О-метилтрансферазы [1]. Мелатонин широко распространен в природе среди филогенетически отдаленных организмов: бактерий, водорослей, растений, а также у беспозвоночных и позвоночных животных, включая человека [2-4]. Являясь эволюционно консервативным веществом, мелатонин рассматривается как плеiotропный регулятор, способный эффективно включаться в координацию различных физиологических процессов и функций [5]. В последние годы накоплено значительное количество экспериментальных данных, установивших связь между нервной, эндокринной и иммунной системами у человека [5, 6]. В этих рамках в настоящее время мелатонин считается одним из членов нейроэндокринно-иммунологической сети [5,6]. Ряд исследований *in vivo* и *in vitro* подтвердили, что мелатонин играет фундаментальную роль в нейроиммунотуляции [7-9]. Стоит отметить, что и иммунологические сигналы, производимые иммунокомпетентными клетками, воспринимаются пинеальной железой и обеспечивают обратную связь в регуляции ее функции [8]. При этом большинство литературных данных касаются механизмов действия и эффектов мелатонина на лимфоциты в норме и при патологиях [7, 8, 10-13]. В то же время исследований по влиянию мелатонина на естественные киллерные клетки, или НК-клетки (Natural killers) - популяцию лимфоцитов, опосредующих неспецифический иммунитет, достаточно мало.

Естественные киллеры без предварительной иммунизации или активации способны распознавать и убивать собственные видоизмененные клетки, продуцировать растворимые факторы, обладающие как антимикробными эффектами, так и способностью вовлекать другие клетки иммунной системы в процессы защиты организма, в частности, взаимодействуя с Т-, В- и дендритными клетками, формируя, таким образом, адаптивный иммунный ответ [14-16]. Важная роль этих зернистых гранулоцитов в формировании устойчивости организма к инфекциям и опухолям обусловлена широким потенциалом поверхностных распознающих рецепторов, позволяющим им реагировать на продукты вирусов и бактерий, цитокины и хемокины, стрессорные сигналы и мембранные структуры трансформированных клеток-мишеней, а также наличием цитоплазматических азурофильных гранул, основными компонентами которых являются перфторин, гранзимы и гранулолизин, с помощью которых осуществляется лизис инфицированных или аутореактивных клеток [14-17].

Выделяют 2 субпопуляции НК-клеток, различающиеся соотношением мембранных маркеров и функциями: CD56^{bright}CD16⁻ (преобладают в периферических лимфоидных органах: в лимфатических узлах, миндалинах, а также в печени, эндометрии матки и децидуальной оболочке плода) и CD56^{dim}CD16⁺ клетки (превалируют в кровотоке) [17]. Последние обладают выраженной цитотоксической активностью и относительно слабо секретируют цитокины, тогда как CD56^{bright}CD16⁻ клетки активно продуцируют IFN γ и другие цитокины (TNF α и β , GM-CSF, IL-10), но проявляют слабую киллерную активность. Только CD56^{bright}CD16⁻ НК-клетки экспрессируют α -цепь рецептора IL-2 (CD25), т.е. несут определяющий клональную специфичность высокоаффинный рецептор для этого цитокина, и выполняют, в связи с этим регуляторные функции. CD56^{dim}CD16⁺ НК-клетки можно охарактеризовать как эффекторные, т.к. их рецептор IL-2 состоит из β - (CD122) и γ -цепей и обладает промежуточной аффинностью, поэтому клетки слабо пролиферируют и только при действии высоких концентраций IL-2 [17, 18]. Цитокинами, наиболее важными для раннего развития НК-клеток, являются IL-15 и IL-17, которые наряду с IL-2, IL-12, IL-18 и IFN α , способствуют росту, дифференцировке, активации и выживанию зрелых естественных киллеров [18]. Flt-лиганд и c-kit также способствуют размножению НК-клеток.

Как показано, мелатонин принимает активное участие в модулировании реакций врожденного иммунитета [19]. На НК-клетки гормон оказывает, в основном, стимулирующее действие, активируя и повышая их количество [19]. Интересно, что гормон стимулирует выработку IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 и IFN- γ мононуклеарными клетками, способствуя ответу лимфоцитов Th1 [20].

Увеличение количества НК-клеток под влиянием мелатонина продемонстрировано при различных физиологических и патологических условиях. Так, в исследовании *in vivo* Currier N.L. и соавторами установлено, что экзогенно вводимый мелатонин способствовал повышению числа естественных киллерных клеток у здоровых молодых взрослых самцов мышей в костном мозге и в селезенке с латентным периодом от 7 до 14 дней [21]. У пациентов, больных раком, иммунологическое лечение IL-2 совместно с мелатонином также вызывало значительное увеличение количества НК-клеток [22]. Аналогичные данные получены у здоровых и лейкозных мышей под воздействием экзогенного гормона. [21, 23]. Повышение числа и функциональной активности НК-клеток, вызванные мелатонином, частично объяснялись усиленным продуцированием цитокинов (IL-2, IL-6, IL-12 и IFN- γ) Т-хелперами, стимулированными гормоном [20, 24]. Кроме того, по некоторым данным НК-клетки, наряду с тучными клетками, тромбоцитами, эпителиоцитами, эозинофилами, могут сами вырабатывать мелатонин [25], а также

экспрессировать ядерные RZR α , ROR α 2 и мембранный MT1 мелатониновые рецепторы и фермент для синтеза гормона HIOMT (Hydroxyindole-O-methyltransferase) у человека [26].

При старении, когда наблюдается снижение иммунного ответа, повышенная восприимчивость к инфекционным заболеваниям, аутовоспалениям, раку и дегенеративным заболеваниям, функциональная компетентность NK-клеток, играющих важную роль в иммунном надзоре, также снижается [27]. И в этом состоянии мелатонин, обладающий антиоксидантными и иммуностимулирующими свойствами, активирует как продукцию NK-клеток, так и высвобождение различных цитокинов из этих клеток [28]. Однако в литературе представлены и некоторые противоположные данные. Показано, что длительное введение мелатонина старым мышам [7], крысам с опухолями молочной железы [29] не имело эффекта относительно цитотоксической активности и количества естественных киллеров. В другом исследовании изучали изменения количества CD57⁺ и CD68⁺ клеток селезенки (NK-клеток и макрофагов, соответственно) после введения мелатонина животным, которых содержали при различных режимах освещения. Длительное введение мелатонина в условиях естественного освещения имело иммуносупрессивный эффект, который проявлялся депопуляцией краевой зоны, белой пульпы и всех зон красной пульпы; потерей паренхимы; разрушением ретикулярной стромы селезенки [30]. В то время как в условиях темноты мелатонин оказывал иммуностимулирующее действие, о чем свидетельствовали повышенный приток иммунокомпетентных клеток в селезенку, их миграция из белой пульпы в краевые зоны и эмиграция в периферическую кровь. Количество CD57⁺ и CD68⁺ клеток также увеличивалось в периартериальных лимфоидных оболочках селезенки и снижалось в В-зависимых зонах органа [30].

Не однозначны результаты исследований по влиянию мелатонина и на цитотоксическую активность NK-клеток. Так, у мышей, подвергнутых пинеалэктомии, наблюдалось снижение активности естественных киллеров, но введение мелатонина восстанавливало активность NK-клеток [8]. Однако хроническое лечение мелатонином не смогло обратить вспять нарушение иммунного ответа у животных, подвергнутых удалению шишковидной железы [8]. Также сообщалось, что мелатонин подавлял активность человеческих NK-клеток *in vitro* [31]. По данным Giordano M. и соавторов введение экзогенного мелатонина предположительно усиливало антителозависимую клеточную цитотоксичность у мышей летом, но не зимой [32]. Huang Y.S. с соавторами обнаружили, что внутрибрюшинная инъекция мелатонина восстанавливала сниженную активность NK-клеток у травмированных крыс [33]. Наконец, экзогенный мелатонин восстанавливал сниженную активность естественных киллеров, вызванную иммунотоксичностью кадмия [34] и свинца [35] у мышей. Кроме того, было высказано предположение, что онкостатическое действие мелатонина включает прямое увеличение активности NK-клеток [36].

Также особо стоит отметить тот факт, что натуральные клетки-киллеры имеют решающее значение для нормального развития беременности [37]. Они продуцируют цитокины, хемокины, ферменты, факторы роста сосудов, тем самым способствуя формированию и моделированию спиральных артерий, плацентации и регуляции инвазии трофобласта [37]. В период ранней беременности NK-клетки являются преобладающей популяцией среди лимфоидных клеток децидуальной оболочки [37]. Децидуальные NK-клетки CD56^{bright}, не обладающие цитотоксической активностью, секретируют в большом количестве цитокины, принимающие участие в имплантации и неоангиогенезе [37]. При беременности цитолитический потенциал пула NK-клеток периферической крови снижается за счет уменьшения процента лимфоцитов CD16⁺CD56^{dim}, а повышение их

содержания в периферической крови ассоциировано с привычным невынашиванием беременности [37]. При патологиях в период гестации меняется и соотношение цитокинов: повышается концентрация IL-2 и IL-12 и снижается концентрация IL-4 и IL-10, хелперный профиль изменяется в сторону Th2 [38]. Как показано выше, мелатонин стимулирует выработку IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , оказывая, тем самым, активирующее действие на NK-клетки, что, соответственно, может негативно сказаться на течении беременности. Учитывая, что в настоящее время активно обсуждается перспектива фармакологического использования гормона при нарушениях или осложнениях при беременности, таких как аборт, преэклампсия и неонатальные неврологические расстройства, обязательно необходимо принимать во внимание иммуномодулирующее действие индола [39].

Таким образом, представленные данные могут, по крайней мере частично, отражать тот факт, что NK-клетки чрезвычайно чувствительны к цитокинам, продуцируемым мелатонин-стимулированными Т-хелперами, и непосредственно влияющим на усиление функции естественных киллеров и/или стимулирование производства новых NK-клеток. Также мелатонин способен напрямую стимулировать NK-клетки, принимая участие в иммунорегуляции.

Поскольку натуральные клетки-киллеры эффективны против множества опухолей, особенно лейкозов и лимфом, регуляция активности NK-клеток и усиление цитолитической функции этих клеток мелатонином имеет большое значение для возможных терапевтических применений [36]. В то же время, делая ставку на позитивные антиоксидантные эффекты мелатонина, необходимо всегда учитывать иммуномодулирующее действие гормона в регуляции как адаптивных, так и врожденных иммунных ответов.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290007-7.

Библиографический список

1. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions / Acuna-Castroviejo D., Escames G., Venegas C. et al. // *Cellular and Molecular Life Science* – 2014. – V. 71. – № 16. – P. 2997-3025.
2. Hardeland R. Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions // *J. Exp. Bot.* – 2015. – V. 66. – № 3. – P. 627-646.
3. Manchester L.C., Poeggeler B., Alvares F.L., Ogden G.B., Reiter R.J. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system // *Cell. Mol. Biol. Res.* – 1995. – V. 41 (5). – P. 391-395.
4. Nocturnal elevation of plasma melatonin and urinary 5-hydroxyindoleacetic acid in young men: attempts at modification by brief changes in environmental lighting and sleep and by autonomic drugs / Vaughan G.M., Pelham R.W., Pang S.F. et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1976. – V. 42. – № 4. – P. 752-764.
5. Mahmood D. Pleiotropic effects of melatonin // *Drug. Res (Stuttg)*. – 2019. – V. 69. – № 2. – P. 65-74.
6. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives / Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S. et al. // *Mini. Rev. Med. Chem.* – 2013. – V. 13. – № 3. – P. 373-384.
7. Carrillo-Vico A., Guerrero J.M., Lardone P.J., Reiter R.J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system // *Endocrine*. – 2005. – V. 27. – P. 189-200.
8. Carrillo-Vico A., Lardone P.J., Varez-Sanchez N., Rodriguez-Rodriguez A., Guerrero J.M. Melatonin: buffering the immune system // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – P. 8638-8683.

9. Markus R.P., Ferreira Z.S., Fernandes P.A., Cecon E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources // *Neuroimmunomodulation*. – 2007. – V. 14. – P. 126-133.
10. Guerrero J.M., Reiter R.J. Melatonin-immune system relationships // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2002. – V. 2. – P. 167–179.
11. Глебездина Н.С., Куклина Е.М. Мелатонин-зависимая регуляция активности Th17 // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2014. – Т.49. – №3. – С. 21-22.
12. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications / Ren W., Liu G., Chen S. et al. // *J. Pineal. Res.* – 2017. – V. 62. – P. e12394.
13. Melatonin as a potential anticarcinogen for non-small-cell lung cancer / Zhiqiang M.A., Yang Y., Chongxi F. et al. // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7. – № 29. – P. 46768–46784.
14. Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells // *Nat. Immunol.* – 2008. – V. – P. 503-510.
15. Lanier L.L. Natural killer cell receptor signaling // *Curr. Opin. Immunol.* – 2003. – V. 15. – P. 308-314.
16. Watzl C., Urlaub D. Molecular mechanisms of natural killer cell regulation // *Front. Biosci.* – 2012. – V. 17. – P. 1418-1432.
17. Ярилин А.А. Иммунология // Учебник. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 752 с.
18. Farag S.S., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development and biology // *Blood. Rev.* – 2006. – V. 20. – P. 123-137.
19. Baeza I., Alvarado C., Alvarez P. Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogens or phyto-oestrogens // *J. Reprod. Immunol.* – 2009. – V. 80. – № 1-2. – P. 70-79.
20. Di Bella G., Mascia F., Gualano L., Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – № 2. – P. 2410-2430.
21. Currier N.L., Sun L.Z., Miller S.C. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating nonspecific immunity // *J. Neuroimmunol.* – 2000. – V. 104. – P. 101-108.
22. Immunological effects of a single evening subcutaneous injection of lowdose interleukin-2 in association with the pineal hormone melatonin in advanced cancer patients / Lissoni P., Barni S., Ardizzoia A. et al. // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 1992. – V. 6. – P. 132-136.
23. Miller S.C., Pandi-Perumal S.R., Esquifino A.I., Cardinali D.P., Maestroni G.J.M. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2006. – V. 87. – P. 81-87.
24. Lissoni P., Rovelli F., Brivio F., Fumagalli L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans // *Nat. Immun.* – 1998. – V. 16. – P. 1-5.
25. Кветной И.М., Южаков В.В. Диффузная эндокринная система // *Руководство по гистологии: в 2 т.* – СПб.: СпецЛит, 2001. – Т. 2. – С. 509-541.
26. Pozo D., Garcia-Maurino S., Guerrero J.M., Calvo H.R. mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells // *J. Pineal. Res.* – 2004. – V. 37. – P. 48-54.
27. Hakim F.T., Flomerfelt F.A., Boyiadzis M., Gress R.E. Aging, immunity and cancer // *Curr. Opin. Immunol.* – 2004. – V. 16. – P. 151-156.
28. Cardinali D.P., Esquifino A.I., Srinivasan V., Pandi-Perumal S.R. Melatonin and the immune system in aging // *Neuroimmunomodulation*. – 2008. – V. 15. – P. 272-278.

29. Melatonin increases the survival time of animals with untreated mammary tumours: neuroendocrine stabilization / Saez M.C., Barriga C., Garcia J.J. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2005. – V. 278. – P. 15-20.
30. Shatskikh O.A., Luzikova E.M. Morpho-functional reaction of spleen natural killer cells and macrophages to melatonin administration to the animals kept on different illumination regimens // *Morfologiya.* – 2012. – V. 141. – P. 43-46.
31. Melatonin-induced suppression of human lymphocyte natural killer activity in vitro / Lewinski A., Zelazowski P., Sewerynek E. et al. // *J. Pineal. Res.* – 1989. – V. 7. – P. 153-164.
32. Giordano M., Vermeulen M., Palermo M.S. Seasonal variations in antibody-dependent cellular cytotoxicity regulation by melatonin // *FASEB J.* – 1993. – V. 7. – P. 1052-1054.
33. Huang Y.S., Jiang J.W., Wu G.C., Cao X.D. Effect of melatonin and electroacupuncture (EA) on NK cell activity, interleukin-2 production and POMC-derived peptides in traumatic rats // *Acupunct. Electrother. Res.* – 2002. – V. 27. – P. 95-105.
34. Kim Y.O., Ahn Y.K., Kim J.H. Influence of melatonin on immunotoxicity of cadmium // *Int. J. Immunopharmacol.* – 2000. – V. 22. – P. 275-284.
35. Kim Y.O., Pyo M.Y., Kim J.H. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead // *Int. J. Immunopharmacol.* – 2000. – V. 22. – P. 821-832.
36. Srinivasan V., Spence D.W., Pandi-Perumal S.R., Trakht I., Cardinali D.P. Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms // *Integr. Cancer. Ther.* – 2008. – V. 7. – P. 189-203.
37. Ширшев С.В., Некрасова И.В., Орлова Е.Г., Горбунова О.Л. Регуляция лептином и грелином экспрессии мембранных молекул и продукции цитокинов НК-клетками периферической крови // *Биологические мембраны.* – 2017. – Т. 34. – № 1. – С. 47-55.
38. Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56^{bright}CD16⁻ NK cells into decidua by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 / Wu X., Jin L.P., Yuan M.M. et al. // *J. Immunol.* – 2005. – V. 175. – P. 61-68.
39. Глебездина Н.С. Мелатонин и беременность // *Высокие технологии, определяющие качество жизни. Материалы II Международной научной конференции.* – 2018. – С. 195-198.

МЕЛАТОНИН-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ Th17 В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ

Глебездина Н.С.¹, Некрасова И.В.¹, Олина А.А.², Куклина Е.М.¹

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

² *ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия.*

Ключевые слова: Т-лимфоциты, Th17, дифференцировка, мелатонин, беременность.

CD4⁺ Т-лимфоциты, продуцирующие интерлейкин-17 (Th17), являются важными факторами воспалительных, аутоиммунных реакций, реакций отторжения трансплантата, играют особую роль в борьбе с бактериальными и грибковыми патогенами, оказывают существенное влияние на течение беременности [1, 2]. Одним из потенциальных регуляторов Th17 является эпифизарный гормон мелатонин, поскольку эти клетки, как и другие лимфоциты, экспрессируют специфические мембранные рецепторы для гормона, MT1 и MT2 [3], а транскрипционный фактор ROR α , который эффективно регулируется

мелатонином и до недавнего времени рассматривался как третий, внутриклеточный, рецептор для данного гормона, служит одним из двух основных дифференцировочных факторов для Th17 [3]. Учитывая ключевую роль субпопуляции Th17 в развитии беременности, ее регуляция мелатонином в этот период представляет особый интерес. В связи с этим, целью работы было изучение роли эндогенного мелатонина в регуляции Th17 в период гестации.

Объектами исследования служили лейкоциты женщин, находящихся в I и III триместрах беременности, и лейкоциты здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Уровень и активность Th17 оценивали *ex vivo* и *in vitro*, в ответ на поликлональную активацию (анти-CD3/CD28), – по экспрессии маркера дифференцировки Th17 – транскрипционного фактора ROR γ 1 (как процент CD4⁺ROR γ 1⁺ Т-лимфоцитов и уровень экспрессии на клетках данного транскрипционного фактора, определяемый как средняя интенсивность свечения (Middle Fluorescence Intensity, MFI; условные единицы)), методом проточной цитометрии, а также по продукции ключевого цитокина этих клеток – IL-17A, иммуноферментным анализом. Вклад эндогенного мелатонина в дифференцировку определяли при культивировании лимфоцитов в присутствии аутологичной сыворотки (как источника гормона) на фоне блокады мембранных рецепторов для мелатонина, MT1/MT2. Одновременно *ex vivo* определялись уровень мелатонина в сыворотке, а также экспрессия CD4⁺Т-лимфоцитами ключевого мембранного рецептора для мелатонина, MT1, и мелатонин-регулируемого фактора ROR α . Статистический анализ проводили с использованием парного и непарного t-критерия Стьюдента, непараметрических Т-критерия Вилкоксона и U-критерия Манн-Уитни в зависимости от того, соответствовало выборочное распределение данных нормальному или нет. Степень взаимосвязи между признаками оценивалась с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

Исследование *ex vivo* выявило увеличение концентрации мелатонина в сыворотке крови в III триместре (рис. 1).

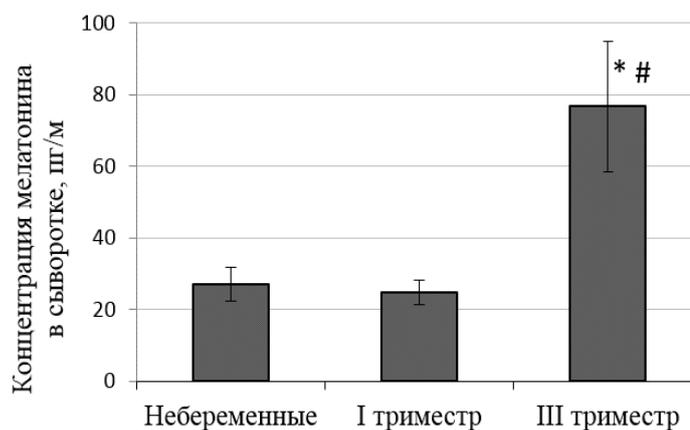


Рис. 1. Изменение концентрации мелатонина в сыворотке при беременности.

Примечание: * $p < 0,05$ (в сопоставлении с соответствующим показателем для небеременных); # $p < 0,05$ (в сопоставлении с соответствующим показателем для беременных I триместра).

Также показано повышение процента CD3⁺MT1⁺ клеток (рис. 2) и уровня экспрессии мембранного рецептора MT1 при беременности (MFI, %: небеременные – 20,75 (17,70; 22,40), I триместр – 24,75 (20,60; 36,45), $p < 0,05$, III триместр – 24,40 (20,20; 27,00), $p < 0,05$ в сопоставлении с соответствующим показателем для небеременных).

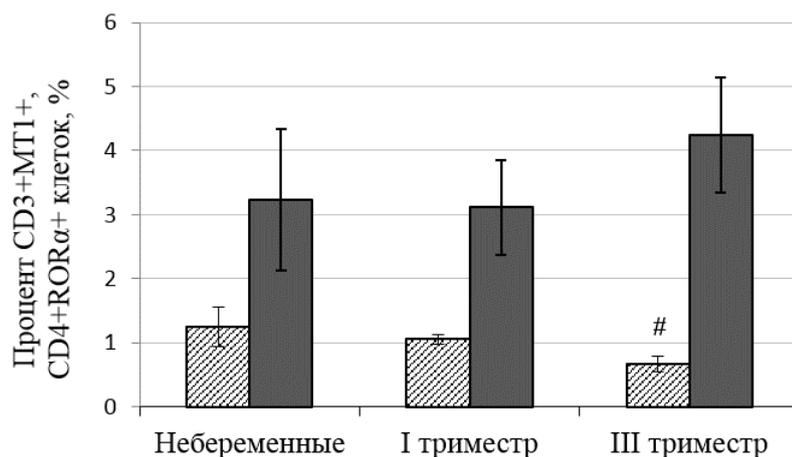


Рис. 2. Экспрессия мелатонинового рецептора и RORα *ex vivo*.

Примечание: заштрихованные столбцы – процент CD4⁺RORα⁺ Т-клеток, темные столбцы – процент CD3⁺MT1⁺ Т-клеток;

#*p* < 0,05 (в сопоставлении с соответствующим показателем для беременных I триместра).

В то же время установлено достоверное снижение при гестации процента CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор RORα (рис. 2), как и его уровня экспрессии. Процент CD4⁺RORγ⁺ Т-клеток не отличался в группах беременных и небеременных женщин, как и сывороточная концентрация основного продукта этих клеток - IL-17A, хотя наблюдалась тенденция к ее снижению в III триместре (концентрация IL-17A, пг/мл: небеременные - 8,48 (8,12; 10,07); I триместр - 4,92 (4,71; 5,36), *p* = 0,05 в сопоставлении с соответствующим показателем для небеременных); III триместр - 5,14 (4,92; 6,60)). Кроме того, анализ корреляционных связей показал прямую зависимость содержания CD4⁺RORγ⁺ Т-клеток от уровня сывороточного мелатонина в группе беременных III триместра (*r*_s=0,810, *p* < 0,05).

Анализ роли эндогенного мелатонина в контроле дифференцировки Th17 *in vitro* в ответ на поликлональную активацию в присутствии аутологичной сыворотки выявил действие гормона, опосредованное сигналами с мембранных мелатониновых рецепторов: как у небеременных, так и у беременных женщин выявлено достоверное снижение содержания CD4⁺RORγ⁺Т-клеток в 48-часовой активированной культуре на фоне блокады MT1/MT2-зависимых сигналов (рис. 3). Достоверных отличий между группами по MFI не обнаружено.

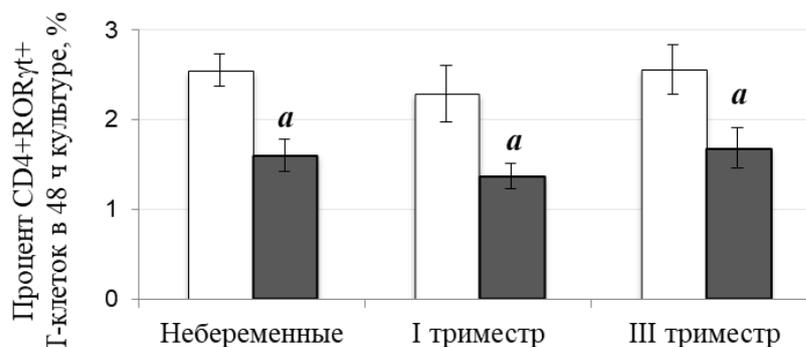


Рис. 3. Изменение процентного содержания CD4⁺RORγ⁺ Т-клеток *in vitro*.

Примечание: белые столбцы – процент CD4⁺RORγt⁺ Т-клеток в 48 ч культуре, темные столбцы – процент CD4⁺RORγt⁺ Т-клеток в 48 ч культуре на фоне блокады MT1/MT2-зависимых сигналов;

^ap < 0,05 (сопоставление с соответствующим показателем для варианта культура 48 ч на фоне активации анти-CD3/CD28).

При оценке синтеза IL-17A в присутствии блокатора мембранных мелатониновых рецепторов наблюдалось снижение концентрации цитокина в культуральных супернатантах, но статистически значимое - только у небеременных (рис. 4). При этом показана положительная корреляционная связь между уровнем сывороточного мелатонина и концентрацией IL-17A в культуральных супернатантах ($r_s=0,738$, $p < 0,05$) в группе беременных III триместра.

В целом, данные, полученные как *ex vivo*, так и *in vitro*, указывают на участие эндогенного мелатонина в развитии и функционировании Th17, причем такая регуляция являлась позитивной. Выявленные иммуномодулирующие эффекты мелатонина должны учитываться при решении вопроса о применении мелатонин-зависимой терапии.

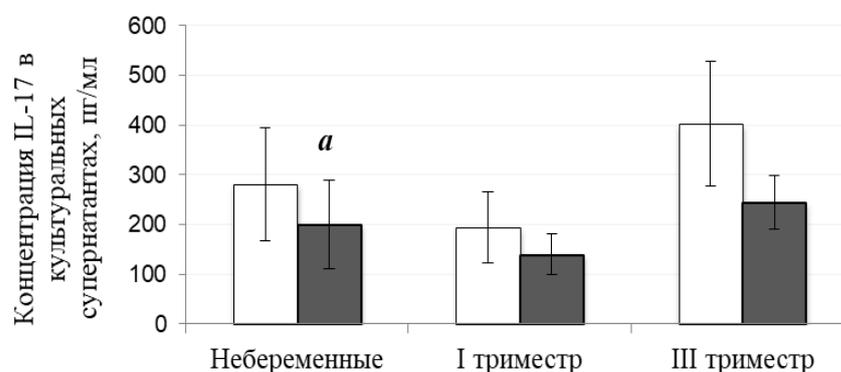


Рис. 4. Изменение концентрации IL-17 в культуральных супернатантах на фоне блокады мелатонин-зависимых сигналов.

Примечание: белые столбцы – концентрация IL-17 в 48 ч культуре, темные столбцы – концентрация IL-17 в 48 ч культуре на фоне блокады MT1/MT2-зависимых сигналов;

^ap < 0,05 (сопоставление с соответствующим показателем для варианта культура 48 ч на фоне активации анти-CD3/CD28).

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 16-34-60094 мол_а_дк и государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290007-7.

Библиографический список

1. Bedoya S.K., Lam B., Lau K., Larkin J. 3rd. Th17 cells in immunity and autoimmunity // Clin Dev Immunol. – 2013. – V.2013. – P. 986789.
2. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion / Liu Y.S., Wu L., Tong X.H. et al. // American Journal of Reproductive Immunology. – 2011. – V. 65. – № 5. – P. 503-511.
3. Slominski R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostrom R.S., Slominski A.T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2012. – V. 351. – № 2. – P. 152–166.

ОСОБЕННОСТИ ВЕСЕННЕГО ПЕРИОДА ПЫЛЕНИЯ В ГОРОДЕ КИРОВ В 2020 Г.

Гребёнкина Е.И., Новоселова Л.В.

*ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: пыльцевой мониторинг, пыльцевые зёрна, аллергенная пыльца, Кировская область.

В 2020 г. в г. Киров аэропалинологические исследования проводились при помощи 2 пыльцеуловителей Дюрама, один из них был установлен на открытом воздухе на высоте 20 метров, другой – в помещении. Выявлены качественный и количественный состав пыльцевого дождя аллергенных растений. Данные о пылении растений позволяют запланировать и реализовать медицинские профилактические мероприятия для больных поллинозом. В два весенних месяца весеннего периода было зафиксировано 45 477 пыльцевых зерен, при этом 36 496 на открытом воздухе и 8 981 в помещении.

В последние годы аэропалинологические исследования в Приволжском федеральном округе приобрели особую актуальность, это связано с ростом числа аллергических заболеваний. Аллергия весной выражена сильнее, чем в любой другой сезон года, по статистике 85% аллергиков страдают от её обострения именно в этот период [1]. Крайне необходимую для больных информацию об аэропалинологическом составе воздуха получают при помощи пыльцеуловителей разных типов. Пыльцеуловитель Дюрама, установленный на высоте 10–20 м, отражает содержание пыльцевых зерен в воздухе и региональный пыльцевой спектр [2].

Новизна исследования заключается в том, что пыльцевой компонент атмосферных аэрозолей, в том числе в г. Киров, остаётся слабо изученным. В ряде работ рассматривалось применение палинологического метода для оценки особенностей окружающей среды г. Кирова в 2014 и 2016 гг. и моделирование распространения аллергенной пыльцы в 2017 и 2019 гг. [3].

Цель исследования – анализ данных аэропалинологического мониторинга в 2020 г. в г. Киров в два месяца весеннего периода.

Материалы и методы. Аэропалинологические данные в 2020 г. получены с помощью 2 гравиметрических пыльцеуловителей Дюрама. Принцип работы прибора заключается в оседании взвешенных в воздухе частиц на специально обработанную поверхность стекла. Пыльцеуловители были установлены на 7 этаже многоквартирного жилого дома на высоте 20 метров, один из них на открытом воздухе на расстоянии 1,5 м от балкона, другой – в комнате площадью 9 м² на подоконнике около окна, установленного на микропроветривание. Показания снимались каждые 72 часа. Идентификация пыльцевых зёрен осуществлялась с помощью микроскопа Olympus BX 61 с системой визуализации изображений Cell В в лаборатории цитогенетики и генетических ресурсов растений ПГНИУ.

Результаты и их обсуждение

Первая весенняя волна характеризуется пылением древесных растений, время массового цветения которых приходится на апрель – май. Весенний период пыления в 2020 г. начался с 9 апреля и характеризовался обилием пыльцевых зёрен древесных растений. С начала июня в пыльцевом спектре появились единичные пыльцевые зёрна таких трав как крапива, щавель и злаки.

В г. Киров за два первых весенних месяца наблюдений было зафиксировано 45 477 пыльцевых зерен, при этом 36 496 на открытом воздухе и 8 981 в помещении.

Таблица 1

Метеорологические условия в г. Киров в 2020 г.
(https://world-weather.ru/pogoda/russia/kirov_1/)

Дата и метеоусловия 9.04 – 5.05.20				Дата и метеоусловия 9.04 – 5.05.20			
Дата	Т, (°С)*	Осадки	Направление ветра, (км/ч)**	Дата	Т, (°С)*	Осадки	Направление ветра, (км/ч)**
09.04	11	облачно	юз. 10,8	06.05	25	ясно	сз. 10,8
10.04	10	слабый дождь	юз. 10,8	07.05	22	облачно	юз. 10,8
11.04	6	облачно	юз. 10,8	08.05	18	слабый дождь	св. 10,8
12.04	0	временами снег	юз. 10,8	09.05	27	ясно	юз. 10,8
13.04	5	облачно	ю. 10,8	10.05	17	дождь	в. 10,8
14.04	10	облачно	ю. 14,4	11.05	17	кратковременный дождь	юз. 14,4
15.04	13	облачно	юз. 10,8	12.05	21	облачно	юз. 10,8
16.04	3	кратковременный дождь	ю. 10,8	13.05	18	слабый дождь	юз. 10,8
17.04	4	слабый дождь	юз. 14,4	14.05	12	облачно	в. 10,8
18.04	6	облачно	юз. 14,4	15.05	11	кратковременный дождь	в. 10,8
19.04	7	слабый дождь	сз. 18	16.05	13	облачно	в. 14,4
20.04	7	кратковременный дождь	с. 10,8	17.05	15	облачно	ю. 10,8
21.04	10	облачно	юв. 14,4	18.05	15	кратковременный дождь	з. 10,8
22.04	1	временами снег с дождем	ю. 14,4	19.05	17	слабый дождь	з. 10,8
23.04	-1	облачно	з. 14,4	20.05	16	кратковременный дождь	сз. 10,8
24.04	1	облачно	з. 10,8	21.05	14	кратковременный дождь	з. 10,8
25.04	2	облачно	з. 10,8	22.05	10	кратковременный дождь	сз. 14,4
26.04	7	облачно	з. 14,4	23.05	11	облачно	юв. 14,4
27.04	7	облачно	з. 10,8	24.05	13	слабый дождь	ю. 10,8
28.04	8	кратковременный дождь	з. 14,4	25.05	14	кратковременный дождь	ю. 10,8
29.04	10	облачно	ю. 10,8	26.05	16	облачно	св. 10,8
30.04	5	кратковременный дождь	св. 10,8	27.05	15	облачно	св. 10,8
01.05	5	облачно	ю. 14,4	28.05	19	облачно	в. 10,8
02.05	7	облачно	с. 10,8	29.05	23	облачно	юз. 10,8
03.05	14	ясно	юв. 10,8	30.05	16	слабый дождь	сз. 10,8
04.05	23	ясно	ю. 14,4	31.05	8	кратковременный дождь	юз. 14,4
05.05	25	ясно	юз. 14,4				

* – средняя температура воздуха за сутки

** – преобладающие скорость и направление ветра за сутки

Обнаруженные пыльцевые зерна представлены 11 таксонами: *Acer* (Клён); *Alnus* (Ольха); *Betula* (Берёза); *Corylus* (Лещина); *Juniperus* (Можжевельник); *Picea* (Ель); *Pinus* (Сосна); *Populus* (Тополь); *Quercus* (Дуб); *Salix* (Ива); *Tilia* (Липа). В атмосфере в период с апреля по май 2020 г. чаще всего встречаются пыльцевые зёрна: *Betula* (38 140); *Pinus* (3 968); *Populus* (2 552). Это связано с преобладанием этих растений в растительности Кировской области [4].

Максимальное содержание пыльцевых зёрен в атмосфере в 2020 г. за трое суток было

зафиксировано на улице 05 – 08.05 и составило 15 052 пыльцевых зёрен, а в помещении 08 – 11.05 – 7 416 пыльцевых зёрен. Именно в эти дни были отмечены наиболее благоприятные погодные условия для пыления растений, такие как температура воздуха 25–30°C, скорость ветра 5–15 км/ч, солнечная погода и отсутствие осадков, что отражено в таблице 1. Эта закономерность, выявленная для г. Киров, согласуется с данными литературы о влиянии погоды на число пыльцевых зерен в воздухе [5].

Минимальное значение зарегистрированных пыльцевых зёрен на улице было отмечено 23 – 26.04 и составило 73 пыльцевых зерна, а в помещении 17 – 20.04 и составило 8 пыльцевых зёрен. Именно в эти даты наблюдалось сильное понижение температуры и осадки, что отрицательно сказалось на пылении растений (таблица 1).

Пыльцевой спектр в помещении беднее, чем на открытом воздухе. За один и тот же период пыльцевых зёрен в помещении улавливается меньше в несколько раз, чем на открытом воздухе. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты аэропалинологических исследований в г. Киров с 9.04 по 1.06. 2020 г. на улице и в помещении

Дата	Место	Таксон и количество пыльцевых зёрен												
		<i>Acer</i>	<i>Alnus</i>	<i>Betula</i>	<i>Picea</i>	<i>Pinus</i>	<i>Populus</i>	<i>Quercus</i>	<i>Salix</i>	<i>Tilia</i>	<i>Corylus</i>	<i>Juniperus</i>	<i>Poaceae</i>	<i>Urtica</i>
09.04.2020-11.04.2020	Улица		11	2		1	44		4	1				
11.04.2020-14.04.2020	Улица	1	3				21							
	Улица	7	17	3			147		2					
14.04.2020 - 17.04.2020	Помещение	1			1		42				2			
	Улица		1				71			1	3			
17.04.2020 - 20.04.2020	Помещение	1					7							
	Улица		7	3			167				2			
20.04.2020 - 23.04.2020	Помещение		1				19							
	Улица		1	4		1	67							
23.04.2020 - 26.04.2020	Помещение	1	1				16							
	Улица	1		13			92				2			
26.04.2020 - 29.04.2020	Помещение			2			27							
	Улица	4		5			130			4				
29.04.2020 - 02.05.2020	Помещение	1		1			31							
	Улица	34	18	1096		2	480		60	4				
02.05.2020 - 05.05.2020	Помещение		2	16			61	21			1			
	Улица	18	2	14770			242		18	2				
05.05.2020 - 08.05.2020	Помещение	4	3	658		1	49		24		5			
	Улица	2	7	11500	18	3	288		14	8				
08.05.2020 - 11.05.2020	Помещение	4	4	7275	20		113							
	Улица	3	8	1379	55	43	100	18	17					
11.05.2020 - 14.05.2020	Помещение		1	93	4	2	8	1	1					
	Улица	3	5	300	27	51	72	9	26		2			
14.05.2020 - 17.05.2020	Помещение			57	1	1	6				3			
	Улица	35	6	272	36	66	103	36			7			
17.05.2020 - 20.05.2020	Помещение	5		78	2	6	23				5			
	Улица			54	2	5	16	2		1	11			
20.05.2020 - 23.05.2020	Помещение		1	16			4		1		1			
	Улица		1	164	2	27	32	24	1	1	6	2		
23.05.2020 - 26.05.2020	Помещение		1	48			9							
	Улица			219	17	552	39	8	1		2	5		
26.05.2020 - 29.05.2020	Помещение			14			23	5				1		
	Улица			76	2	3067	15	1	2		9	3	2	11
29.05.2020 - 01.06.2020	Помещение			22			117	6						

Таким образом, полученные данные для г. Киров, применимы для Кировской области, т.к. пылеуловитель Дюрама, установленный на высоте 10 – 20 м, дает данные о концентрации пыльцевых зёрен в воздухе радиусом около 50 км от места сбора и отражает региональный пыльцевой спектр. В апреле и мае 2020 г. в городе Киров состав пыльцевого спектра представлен 11 таксонами с преобладанием пыльцевых зёрен *Betula* (38 140); *Pinus* (3 968); *Populus* (2 552). При сопоставлении результатов аэропалинологического исследования на улице и в помещении было выявлено, что в помещении регистрируется в 4–5 раз меньше пыльцевых зерен, чем на открытом воздухе (36 496 на открытом воздухе и соответственно 8 981 в помещении). Также были выявлены закономерности пыления растений от метеорологических условий. При благоприятных погодных условиях для цветения растений, улавливается большее число пыльцевых зёрен. Усиление ветра и осадки

снижают содержание пыльцевых зерен в воздухе.

Библиографический список

1. Адо В.А., Астафьева Н.Г. Полинозы. – М.: Изд-во «Знание», 1991. С. 76 – 81.
2. Осмонбаева К.Б., Кобзарь В.Н. Сравнительный анализ методов улавливания пыльцы растений и спор грибов // Материалы конференции "European scientific conference". Пенза: Издательство «Наука и Просвещение», 2017. С. 70–75.
3. Именитова А. С., Пупышева С. А., Жуйкова И. А. Анализ таксономического состава и динамики аэропалинологического спектра Северо-Востока Русской равнины // Научно- методический электронный журнал «Концепт». 2016. Т. 15. С. 871–875.
4. Видякина А.И., Ашихмина Т.Я., Новоселова С.Д. Леса Кировской области. Киров: ОАО «Кировская областная типография», 2008. 400 с.
5. Singh A.B., Babu C.R. Studies on pollen allergy in Dehli. Diurnal periodicity of common allergenic pollen // Allergy. 1980. Vol. 35, № 4. P. 311-317.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УЧИТЕЛЯ-ЛОГОПЕДА И ПЕДАГОГА-ПСИХОЛОГА В КОРРЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ С ДЕТЬМИ С ОВЗ В ДОУ

Елькина Е.Б., Рушак С.А.

МБДОУ «Детский сад «Калейдоскоп», г. Краснокамск, Пермский край, Россия.

Ключевые слова: дети с ограниченными возможностями здоровья, психолого-педагогическая и логопедическая помощь.

На современном этапе развития общества проблема обучения и воспитания детей с различными речевыми нарушениями стоит чрезвычайно остро. Сегодня такие дети составляют самую многочисленную группу из всех детей дошкольного возраста. Задача ДОУ дать полноценную, всестороннюю помощь в коррекции нарушений у данных детей и способствовать в дальнейшем, успешной социализации в обществе.

Современная психолого-педагогическая литература описывает этих детей такими наиболее распространёнными терминами как «дети с особенностями развития» и «дети с ограниченными возможностями» - имеющие временные или постоянные отклонения в физическом и (или) психическом развитии и нуждающиеся в создании специальных условий обучения и воспитания.

К детям с нарушениями речи относятся дети с психофизическими отклонениями различной выраженности, вызывающими расстройства коммуникативной и обобщающей (познавательной) функции речи. От других категорий детей с особыми потребностями их отличает нормальный биологический слух, зрение и полноценные предпосылки интеллектуального развития. Выделение этих дифференцирующих признаков необходимо для отграничения от речевых нарушений, отмечаемых у детей с олигофренией, ЗПР, слепых и слабобудущих, слабослышащих, детей с РДА и др.

Ещё Л. С. Выготский отмечал, что дефект какого-нибудь анализатора или интеллектуальный дефект не вызывает изолированного выпадения одной функции, а приводит к целому ряду отклонений. То есть, не существует речевых расстройств, при которых не отмечались бы другие психологические нарушения. Вместе они образуют сложный психологический профиль отклонений в психическом развитии у детей, в структуре которого одним из ведущих синдромов являются речевые нарушения [1].

У детей с ограниченными возможностями здоровья (с речевыми нарушениями) при нормальном интеллекте зачастую наблюдается снижение познавательной деятельности и

входящих в её структуру процессов: меньший объём запоминания и воспроизведения материала, неустойчивость внимания, быстрая отвлекаемость, истощаемость психических процессов, снижение уровня обобщения и осмысления действительности; у них затруднена развёрнутая связная речь. Со стороны эмоционально-волевой сферы также наблюдается ряд особенностей: повышенная возбудимость, раздражительность или, наоборот, общая заторможенность, замкнутость, обидчивость, плаксивость, многократная смена настроения.

Именно поэтому наряду с развитием речи важно развивать у таких детей сразу все психологические процессы, такие как внимание, память, мышление, эмоциональную сферу и прочее.

Таким образом, прослеживается необходимость взаимодействия учителя-логопеда с педагогом-психологом для создания единого коррекционно-образовательного пространства вокруг ребёнка с ОВЗ (речевыми нарушениями) [2].

Коррекционно-развивающая деятельность логопеда и психолога представляет собой целостную систему, исполняющую диагностическую, коррекционно-развивающую и профилактическую функции. Сотрудничество учителя-логопеда и педагога-психолога предусматривает взаимодействие в процессе коррекционно-развивающей образовательной деятельности, стимулирующей речевое, познавательное и личностное развитие ребёнка. Основу организации такого взаимодействия определяют следующие принципы:

1. Системность: нельзя развивать только одну функцию, необходима системная работа по развитию ребенка.

2. Комплексность (взаимодополняемость): развитие одной познавательной функции определяет и дополняет развитие других функций.

3. Соответствие возрастным и индивидуальным возможностям: индивидуальная программа работы с ребенком должна строиться в соответствии с психофизиологическими закономерностями возрастного развития.

4. Адекватность требований и нагрузок, предъявляемых к ребенку в процессе занятий; постепенность, следование от простых и доступных заданий к более сложным, комплексным.

Тесная взаимосвязь учителя-логопеда и педагога-психолога возможна при условии совместного планирования работы, при правильном и четком распределении задач каждого участника коррекционно-образовательного процесса, при осуществлении преемственности в работе и соблюдении единства требований, предъявляемых детям (табл. 1).

Основные этапы взаимодействия учителя-логопеда и педагога-психолога

1 этап – Организационный – диагностический (сентябрь-октябрь)

Проводится психолого – педагогическая и логопедическая диагностика детей с ОВЗ.

Заполнение индивидуальных карт развития ребенка.

Организация и проведение психолого – медико – педагогического консилиумов.

Информирование о результатах диагностики, настрой родителей и педагогов на эффективную коррекционную работу с детьми.

Для диагностики речевых нарушений у детей с ОВЗ учителем-логопедом использовался диагностический альбом «Альбом для логопеда» автора Иншаковой О.Б., для определения уровня развития познавательной и эмоционально-волевой сферы педагогом – психологом методическое пособие «Психолого-педагогическая диагностика развития детей раннего и дошкольного возраста» под редакцией Е.А. Стребелевой с приложением альбома «Наглядный материал для обследования детей».

На начало учебного года был обследован учителем – логопедом и педагогом-психологом 31 ребёнок 5-6 летнего возраста с речевыми нарушениями, из них 14 девочек и 17 мальчиков. При диагностике детей было выявлено: 31 ребёнок с низким уровнем

речевого развития, при этом 15 детей (7 девочек и 8 мальчиков) с нарушением в познавательной сфере и 24 детей (19 мальчиков и 5 девочек) с нарушением в эмоционально-волевой сфере. На конец первого года обучения были достигнуты следующие результаты: 2 ребёнка с низким уровнем, 29 детей (14 девочек и 15 мальчиков) достигли среднего уровня речевого развития; 4 детей с низким уровнем, 15 с средним и 12 с высоким развитием в познавательной сфере; 6 детей с низким уровнем, 15 с средним и 10 с высоким уровнем развития в эмоционально-волевой сфере.

Таблица 1

Задачи коррекционной работы

Задачами коррекционной работы учителя-логопеда	Задачи коррекционной работы педагог-психолог
<ul style="list-style-type: none"> - Обследование воспитанников и выявление среди них детей, нуждающихся в профилактической и коррекционно-речевой помощи и определение основных направлений и содержания работы с каждым из них; - систематическое проведение необходимой профилактической и коррекционно-речевой работы с детьми в соответствии с их индивидуальными программами; - оценка результатов помощи детям и определение степени их речевой готовности к школьному обучению; - формирование у педагогического коллектива информационной готовности к логопедической работе, оказание им помощи в организации полноценной речевой среды; - повышение педагогической компетенции родителей. 	<ul style="list-style-type: none"> - Психолого-педагогическая диагностика развития детей раннего и дошкольного возраста - создание среды психологической поддержки детям с ОВЗ; - развитие памяти, внимания, мышления, восприятия, воображения детей; - совершенствование мелкой моторики; - развитие произвольности и навыков самоконтроля, волевых качеств; - снятие тревожности у детей при негативном настрое на учебный процесс; - обеспечение психологической готовности к школьному обучению; - повышение психологической культуры родителей и педагогов.

По результатам проведённой коррекционной работы на конец второго года обучения: 7 детей с средним уровнем и 24 ребёнка с высоким уровнем речевого развития; 1 ребёнок с низким уровнем, 11 с средним и 19 с высоким развитием в познавательной сфере; 1 ребёнок с низким уровнем, 9 с средним и 21 с высоким уровнем развития в эмоционально-волевой сфере (табл. 2).

Результаты:

Создание индивидуальных коррекционных программ помощи ребёнку с ОВЗ.

Разработка программ групповой (подгрупповой) работы с детьми.

Проектирование взаимодействия специалистов ДОУ и родителей.

2 этап – Основной - коррекционно-развивающий

Решение задач, заложенных в индивидуальных и групповых коррекционных программах. Проведение интегрированных занятий два раза в месяц.

Осуществление логопедического и психологического мониторинга.

Создание и реализация проектной деятельности.

Психолого-педагогическое просвещение родителей.

Выделяются следующие направления и формы совместной работы логопеда и психолога в дошкольном учреждении:

– проведение диагностики и обсуждение ее результатов (логопед обследует речь, психолог – уровень развития познавательной и эмоциональной сферы);

– коррекционно-развивающие занятия (на логопедических активизируется речевое высказывание детей, а на занятиях психолога используются приёмы по активизации познавательных процессов, изучению и уточнению эмоциональных состояний, доступных возрасту). Методы и приемы совместной деятельности с детьми учителя-логопеда и педагога – психолога: сказкотерапия, арт-терапия, психогимнастика, кинезиология, коррекция эмоциональной сферы, развитие мелкой моторики рук, развитие познавательных процессов ведется с использованием методических пособий [3].

– интегрированные занятия с детьми. Интегрированное построение занятий дает возможность детям реализовать свои творческие возможности, развить коммуникативные умения, познавательную активность (табл. 3) [4].

Таблица 2

Оценка уровня развития обучающихся старшего и подготовительного возраста до и после коррекционно-развивающей работы

1 год обучения: Старший возраст 5-6 лет

Уровни оценки развития / % соотношение	Речевые сфера		Познавательная сфера		Эмоционально-волевая сфера	
	Начало уч. года	Конец уч. года	Начало уч. года	Конец уч. года	Начало уч. года	Конец уч. года
Низкий уровень	100%	6,4%(2р)	48,4%	12,9%	77,4%	19,3%
Средний уровень	0 %	93,6%(29д)	35,5%	48,4%	16,2%	48,4%
Высокий уровень	0 %	0 %	16,1%	39,2%	6,4,%	32,3%

2 год обучения: Подготовительный возраст 6-7 лет

Уровни оценки развития / % соотношение	Речевые сфера		Познавательная сфера		Эмоционально-волевая сфера	
	Начало уч. года	Конец уч. года	Начало уч. года	Конец уч. года	Начало уч. года	Конец уч. года
Низкий уровень	6,4% (2р)	0%	12,6%	3,2%	19,5%	3,2%
Средний уровень	93,6 % (29д)	22,4%(7д)	48,2%	35,5%	48,4%	29,0%
Высокий уровень	0 %	77,6%(24р)	39,2%	61,3%	32,1%	67,8,%

Консультирование и просвещение педагогов и родителей.

Не следует забывать, что результат коррекционной деятельности в образовании во многом зависит от участия родителей [5]. Необходимо повышать психологическую грамотность родителей, снижать уровень отстраненности родителей от работы по исправлению речевых нарушений у детей, так как создание единого коррекционного пространства развития ребенка возможно при условии тесного сотрудничества педагогов, воспитателей и родителей. Поэтому идея сопровождения ребёнка с ОВЗ (речевыми нарушениями) по сотрудничеству с родителями реализуется через создание клуба «Заботливых родителей». Организуемые мероприятия: родительские собрания, тренинги

для родителей, мастер-классы, круглые столы, семинары-практикумы, квесты, которые проходят 1 раз в месяц, а также индивидуальные и групповые консультации, стендовая информация, на которой освещаются вопросы психологии и речевого развития, приносят свои положительные результаты.

Таблица 3

Задачи интегрированного занятия

Дидактические	Коррекционные	Воспитательные
Обогащать, уточнять и активизировать языковые навыки воспитанников; закреплять, уточнять и обогащать знания по теме (в соответствии с календарно-тематическим планированием интегрированного занятия); учить ребенка применять языковые средства (вербальные и невербальные) в различных видах деятельности.	Закреплять навыки правильного звукопроизношения; грамматического структурирования высказывания; преодолевать нарушения темпо-ритмической стороны речи и движений; преодолевать нарушения просодической стороны речи; преодолевать нарушения эмоционально-волевой сферы и поведения; развивать высшие психические функции.	Вызывать желание вступать в контакт с окружающими; воспитывать умение организовать общение, включающее умение слушать собеседника; воспитывать гуманистическое, толерантное отношение к сверстникам, товарищам; воспитывать умения взаимодействовать в команде.

Результаты: Устранение у детей отклонений в речевом и психологическом развитии.

Повышение компетентности у родителей и педагогов по вопросам речевого и психологического развития детей.

3 этап - Заключительный - аналитический этап.

Оценка результативности коррекционной работы с детьми.

Корректировка индивидуальных и групповых программ.

Отчет по проделанной работе.

Аналитическая деятельность позволяет нам отследить эффективность коррекционно-развивающей работы при тесном сотрудничестве логопеда и психолога, т. е. выделить все возможные положительные и отрицательные стороны этой деятельности, так же отследить динамику развития ребенка. Предполагается разработка критериев динамики развития ребенка, с учетом выделенных факторов риска и выделить основные критерии эффективности коррекционно-развивающей работы.

Разработанный проект взаимодействия педагога-психолога и учителя-логопеда позволил достичь следующих результатов:

Качественное изменение в речевом развитии детей;

Рост профессионализма педагогов в области коррекционно-развивающей деятельности;

Повышение педагогической компетентности родителей.

Результативность

Взаимодействие психолога и логопеда способствует эффективным, качественным изменениям в речевом развитии детей, профессиональной подготовке педагогов, росту компетентности родителей в области коррекционной педагогики. В процессе коррекционно-развивающей деятельности необходима своевременная ранняя поддержка

ребенка педагогами и родителями, которая позволяет предупредить многие проблемы и вовремя откорректировать их с наименьшими затратами сил.

Современные тенденции модернизации образования диктуют необходимость всесторонней и тщательной проработки организационно-содержательных аспектов психолого-логопедической помощи детям. Традиционная образовательная деятельность необходима, но она основывается на тренировочных упражнениях, которые быстро утомляют воспитанников, особенно тех у которых нарушена не только звуковая, но и смысловая сторона речи. У таких детей часто наблюдается неумение слушать и слышать, согласовывать свои действия с действиями других, отсутствие самоконтроля, отмечаются проблемы, связанные с наличием вторичных отклонений в развитии психических процессов. Изучив научно-методическую литературу, проведя совместную коррекционную работу с детьми с ОВЗ (с речевыми нарушениями), оценили острую потребность современной практики, мы увидели актуальность интегрированного подхода в деятельности педагога-психолога и учителя-логопеда. Комплексный и системный подход к решению проблем, связанных с речевыми нарушениями у детей является основой для взаимодействия данных специалистов.

Библиографический список

1. Выготский Л.С. Мышление и речь. – М., 1996.
2. Давыдова М.С. «Взаимосвязь логопеда со специалистами ДОУ» // Логопед 2008 №1 С.108-121
3. Чернова Е. П. Психологическая помощь дошкольникам с нарушениями речи [Текст] / Е. П Чернова. // Логопед в детском саду -2008 - №8(33) – С.51- 55
4. Бачина О. В., Левашева Г. Ф., Попова Т. А Интегрированный подход в коррекционно – развивающей деятельности учителя – логопеда ДОУ [Текст] / О. В. Бачина // Логопед. - 2009. - № 1. - С. 12-17
5. Цветкова, Т.В. Социальное партнерство детского сада с родителями / Т.В. Цветкова // Библиотека журнала «Управление ДОУ». – М.: ТЦ Сфера, 2013. – 128 с.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ НОВОГО РП-ПОДОБНОГО БЕЛКА ROtN ИЗ *LACTOBACILLUS HILGARDII*

Журавлева Д.Э., Исхакова З.И., Каюмов А.Р.

*ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, Россия*

Ключевые слова: РП-белки, регуляция азотного обмена, фактор транскрипции, транспорт полиаминов, *Lactobacillus*

Бактерии рода *Lactobacillus* – грамположительные, палочковидные, микроаэрофильные неспорообразующие бактерии. Лактобациллы широко распространены в природе, в организме человека и животных и занимают различные ниши преимущественно с высоким содержанием питательных веществ и широко используются в различных биотехнологиях. Несмотря на это, их азотный метаболизм остается слабо изученным.

Одними из ключевых регуляторных белков в азотном метаболизме бактерий являются РП-белки. РП – семейство сигнальных белков, контролирующих широкий спектр мишеней в клетке. РП белки координируют центральный метаболизм углерода/азота путем регулирования активности широкого спектра ферментов, транскрипционных факторов и

мембранных транспортных белков в клетке в ответ на внутриклеточный уровень АТФ, АДФ, кетоглутарата и глутамин [1, 2]. Из 280 видов рода *Lactobacillus*, известных на сегодняшний день, только 5 видов имеют гены, кодирующие РII-подобные белки в геноме. Геном *L. hilgardii* LMG 07934 содержит только один ген, кодирующий белок с гомологией к РII-подобным белкам [3]. В отличие от классических генов, кодирующих РII белки, *glnB*, большинство из которых являются моноцистронными, или *glnK*, которые обычно организованы в опероне с геном транспортера аммония *amtB*, у лактобацилл гены гомологов РII, если они присутствуют, связаны с опероном *potABCD*, кодирующим ABC-транспортер для спермидина/путресцина. На основании этого уникального генетического окружения белок был обозначен как PotN (нуклеотид связывающий Pot белок). Нахождение гена в опероне *potABCD* позволяет предположить возможную роль этого РII белка в регуляции соответствующей активности поглощения полиаминов. Хотя ни один из белков PotABCD не ко-элюировался с белком PotN из клеточного экстракта *L. hilgardii*, в элюате идентифицировались белок GlnR семейства факторов транскрипции MerR и дегидрогеназа альфа-кетокислот AcoB, что позволяет предположить участие PotN в регуляции активности данных белков.

Чтобы охарактеризовать физиологическое значение PotN, белки PotN, GlnR, AcoB и C-концевой домен белка PotA экспрессировали в кишечной палочке и очищали с помощью аффинной хроматографии.

Исследование взаимодействия PotN с GlnR *in vitro* методами ко-элюции и микроколичественного термофореза показало, что аффинность белков в присутствии АТФ в 3 раза ниже чем в присутствии АДФ. Эти данные так же были подтверждены *in vivo* с помощью бактериальной дигибридной системы [4].

Белки GlnR в клетках разных бактерий принимают участие в регуляции метаболизма азота. Анализ аминокислотной последовательности GlnR выявил наличие характерного ДНК-связывающего мотива спираль-поворот-спираль. Этот факт позволяет предположить наличие у белка GlnR ДНК-связывающих свойств. Исследование ДНК-связывающей активности GlnR методом задержки в геле показало, что GlnR взаимодействует с ДНК только при больших концентрациях белка, при добавлении белка PotN ДНК-связывающая активность GlnR повышается, и комплекс GlnR-ДНК образуется при в 10 раз меньших концентрациях белка GlnR. Следовательно, PotN повышает ДНК-связывающую активность GlnR. Затем методом гельфильтрации было показано, что белок GlnR не способен к димеризации в условиях *in vitro* в отличие от белков GlnR из *Lactobacillus plantarum* и *Bacillus subtilis*. Также гельфильтрация позволила установить, что тример белка PotN может связывать либо три, либо два, либо один димер GlnR. В отсутствие эффекторных молекул образуются все виды комплексов, а в присутствии АТФ и АДФ комплексы образуются в небольших количествах, исследуемые белки находятся в основном в виде мономеров. Мы предполагаем, что в присутствии эффекторных молекул изменяется конформация белка PotN, что препятствует его связыванию с GlnR.

Таким образом, в зависимости от доступности питательных веществ для клетки белок PotN может связывать от одного до трех димеров GlnR, тем самым повышая его ДНК-связывающую активность. Этот механизм можно назвать способом регуляции активности GlnR по аналогии с фактором транскрипции TnrA из бацилл [5].

Белки PotABCD представляют собой ABC-транспортер полиаминов спермидина/путресцина, который состоит из субстрат-связывающего белка PotD, расположенного на наружной стороне мембраны, двух каналобразующих белков PotB и PotC и АТФазы PotA связанной с каналобразующими белками и расположенной на внутренней стороне мембраны [6]. Исходя из расположения белков, наиболее вероятным

белком для взаимодействия с PII белком является белок PotA. С помощью ИТС было выявлено, что PotAc взаимодействует с АТФ, но не с путресцином и спермидином, однако присутствие магния подавляет взаимодействие с АТФ. Белок не обладает АТФазной активностью, скорее всего это является следствием того, что белок находится не в полноценном состоянии.

Для верификации взаимодействия белка PotN с белком PotA были использованы как методы *in vitro* (микротермофорез), так и *in vivo* (бактериальная дигибридная система). Данные микротермофореза показали, что сродство белков PotN и PotA различается в 2 раза в зависимости от присутствия 2 мМ АТФ или 2 мМ АДФ.

Взаимодействие белков *in vivo* исследовали с помощью бактериальной дигибридной системы [4]. Так как PotN имеет способность связывать АТФ и АДФ, при этом связывание АДФ происходит в примерно 7 раз эффективнее связывания АТФ, были смоделированы различные условия: голодания (среда LB разбавленная в 10 раз) и избытка энергетического субстрата (1% глюкозы в LB), в результате чего содержание АТФ в клетках составляло соответственно 65% и 145% от содержания в клетках, выращенных в простой среде LB. При повышенном содержании глюкозы, активность β -галактозидазы незначительно возрастала, что указывает на повышение эффективности взаимодействия PotN-PotA при высоких концентрациях АТФ. В условиях голодания активность β -галактозидазы снижалась, что говорит о негативном влиянии АДФ на взаимодействие белков. Таким образом, сродство PotN к белку PotAc зависит от внутриклеточного соотношения АТФ/АДФ и может отражать молекулярный механизм регуляции поглощения полиаминов в зависимости от энергетического состояния клетки.

Таким образом, белок PotN, по всей видимости, является модулятором ДНК-связывающей активности фактора транскрипции GlnR в клетках *L. hilgardii*. Стабилизация комплекса PotN-GlnR и повышение ДНК-связывающей активности GlnR в присутствии АДФ, и дестабилизация в присутствии АТФ позволяет предположить, что специфическим сигналом данной системы является энергетический статус клетки, который выражается в соотношении АТФ/АДФ в клетке и в зависимости от него происходит активация/репрессия генов GlnR-регулона.

Физиологическое значение взаимодействия PotN с PotA может заключаться в регуляции поступления полиаминов в клетку, по аналогии регуляции белком GlnK активности АВС-транспортера ионов аммония AmtB. Также остается неясной значимость связывания PotN с дегидрогеназой альфа-кетокислот. Молекулярные механизмы этих белковых взаимодействий и их роль в регуляции метаболизма клетки требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук (№ МД-572.2020.4).

Библиографический список

1. Forchhammer K. P(II) signal transducers: novel functional and structural insights // Trends Microbiol. – 2008. – V.6. – P.65-72.
2. Merrick M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins // Front. Microbiol. – 2015. – V.5. – P.763.
3. Zhuravleva D. E., Iskhakova Z. I., Ozhegov G. D., Gogoleva N. E., Khusnutdinova D. R., Shagimardanova E. I., Forchhammer K., Kayumov A. R. Complete Genome Sequence of *Lactobacillus hilgardii* LMG 7934, Carrying the Gene Encoding for the Novel PII-Like Protein PotN // Curr. Microbiol. – 2020. – P. 1-8.

4. Battesti A., Bouveret E. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli* // *Methods*. – 2012 – V.58. – P.325-334.

5. Hauf K, Kayumov A., Gloge F., Forchhammer, K. The molecular basis of TnrA control by glutamine synthetase in *Bacillus subtilis* // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291(7). – P. 3483-3495.

6. Igarashi, K. Kashiwagi K. Polyamine transport in bacteria and yeast // *Biochem J.* – 1999. – V.344. – P.633–642.

ГЛИКОДЕЛИН КАК ФАКТОР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК

Заморина С.А.^{1,2}, Ужвиюк С.В.^{1,2}, Шардина К.Ю.², Кропанева М.Д.², Тимганова В.П.², Бочкова М.С.², Храмцов П.В.², Раев М.Б.^{1,2}

¹*Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь*

²*«ИЭГМ УрО РАН», филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук" (ПФИЦ УрО РАН), Пермь*

Гликоделин (PP14, PAEP, альфа-2-микроглобулин, димерный гликопротеин с молекулярной массой 42 до 56 кД) рассматривается как маркер рецептивности репродуктивной ткани. Невзирая на то, что иммунодепрессивные эффекты гликоделина хорошо известны [1], его роль в регуляции миелоидных супрессорных клеток (MDSC) не изучена. Объектами исследования были сепарированные мононуклеарные клетки здоровых доноров, которые при помощи цитокинов (IL-6 и GM-CSF) индуцировали в фенотип MDSC, оценивая как полиморфноядерные (PMN-MDSC), так и моноцитарные (M-MDSC) субпопуляции этих клеток. Предварительно была проведена серия экспериментов по созданию оптимальных условия для получения MDSC из мононуклеарных клеток человека [2]. Целью работы являлось изучение роли гликоделина в физиологических концентрациях, в регуляции дифференцировки MDSC.

Материалы и методы. Для генерации MDSC *in vitro* мононуклеарные клетки из периферической крови добровольцев-доноров сепарировали путем центрифугирования на градиенте плотности 1,077 г/см³ (Ficoll-Нураque, Sigma-Aldrich). Затем полученные клетки культивировали в 24-луночном планшете в концентрации 1x10⁶ клеток/мл в ППС с внесенными в среду цитокинами IL-6 (20 нг/мл), GM-CSF (40 нг/мл) в течение 14 суток при 5 % CO₂ и 37 °C. Замена среды в культуре производилась на 7 сутки, тогда же повторно вносили цитокины, а на 11 сутки вносили рекомбинантный гликоделин (MyBioSource. Inc., США) в физиологических концентрациях (0,2; 2мкг/мл). В культурах оценивали уровень M-MDSC (Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD66b⁻) и G-MDSC (Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺CD14⁻CD66b⁺) методом проточной цитометрии (CytoFlexS (Beckman Coulter)) при помощи антител “R&D Systems” по стандартной методике. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prizm 6 при помощи критерия Фридмана.

Результаты. Установлено, что гликоделин не оказывал существенного влияния на жизнеспособность клеток, оцениваемую методом проточной цитометрии (Zombi Aqua). Показано, что гликоделин (2 мкг/мл) повышал процент MDSC в индуцированных культурах мононуклеарных клеток человека. При анализе субпопуляций установлено, что GdA (2 мкг/мл) повышал уровень PMN-MDSC, в то время как уровень M-MDSC достоверно не изменялся. Данный результат можно интерпретировать как фетопротективный эффект

гликоделина, поскольку повышение уровня G-MDSC связывают с подавлением иммунного ответа на патернальные антигены. Известно, что уровень PMN-MDSC увеличивается в периферической крови здоровых беременных женщин на всех стадиях беременности по сравнению с небеременными, тогда как число M-MDSC остается без изменений [3]. В то же время, у пациенток с выкидышем более чем на 30 % снижено количество MDSC в крови и эндометрии, особенно в первом триместре [4]. В период физиологической беременности PMN-MDSC накапливаются в плаценте, но при спонтанном аборте их количество уменьшается. Плацентарные PMN-MDSC эффективно подавляют T-клеточный ответ, одновременно поляризуя CD4⁺-лимфоциты в фенотип Th2 [5]. Вероятно, PMN-MDSC играют важную роль в индуцировании и поддержании толерантности к антигенам плода, что позволяет рассматривать их как перспективную мишень терапевтического манипулирования при осложнениях беременности. В целом, мы впервые продемонстрировали влияние GdA на процесс дифференцировки MDSC.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-29-04055 мк

Библиографический список

1. Bochkova M.S., Zamorina S.A., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Rayev M.B. The role of glycodeilin in the regulation of the immune system in the context of developing pregnancy // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21. № 4. С. 603-616.
2. Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк У.В., Шардина К.Ю., Заморина С.А., Раев М.Б. Получение миелоидных супрессорных клеток человека в экспериментальной модели *in vitro* // Российский иммунологический журнал. 2020. Т. 23, № 2, С. 157-162.
3. Kostlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marme A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C. F., Gille C. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses // Eur. J. Immunol. 2014. № 44(9), P. 2582–2591.
4. Nair R.R., Sinha P., Khanna A., Singh K. Reduced Myeloid-derived Suppressor Cells in the Blood and Endometrium is Associated with Early Miscarriage // Am J Reprod Immunol. 2015. № 73 (6). P.1046–7408.
5. Köstlin N., Hofstädter K., Ostermeir A.L., Spring B., Leiber A., Haen S., Abele H., Bauer P., Pollheimer J., Hartl D., Poets C.F., Gille C. Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Human Placenta and Polarize toward a Th2 Phenotype // Journal of Immunology. 2016. № 196(3). P.1132–1145.

РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *TETRADESMUS OBLIQUUS*

Зиганшина Э.Э., Булынина С.С., Ахметова Р.Ф., Зиганшин А.М.

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Россия

Ключевые слова: зеленые микроводоросли, биомасса, *Tetradismus obliquus*, среда Болда, эффлюент

Исследование метаболизма микроводорослей как организмов, способных преобразовывать углекислый газ в органические соединения за счет энергии света, сегодня привлекает большой интерес в науке и имеет большое прикладное значение в различных биотехнологиях. Микроводорослям для роста и развития, помимо углекислого газа, необходим свет в качестве источника энергии, макроэлементы, среди которых азот, фосфор и сера выступают в качестве основных, а также микроэлементы, такие как молибден, марганец, кобальт, железо, цинк, бор. В настоящее время за рубежом успешно функционируют коммерческие предприятия по производству как биомассы

микроводорослей, так и ценных биопродуктов их метаболизма (в частности, в таких странах как Нидерланды, Германия, Швеция, США, Израиль, Австралия, Китай). Так, по оценкам ученых, в год производится свыше 5000 тонн сухой биомассы микроводорослей, из которой производят такие продукты как биотопливо, кормовые продукты для животноводства, соединения для фармацевтической и химической промышленности. В связи с этим, работы по выделению и характеристике новых представителей микроводорослей, в том числе и продуцентов новых биопродуктов, необходимы для успешного технического исполнения разнообразных альгобиотехнологий [1–5].

В последние годы штаммы зеленых микроводорослей вида *Tetradesmus obliquus* (ранее известный как *Scenedesmus obliquus* и *Acutodesmus obliquus*, *Chlorophyta*) были включены в ряд перспективных и промышленно значимых микроводорослей для производства целого ряда ценных продуктов, в частности липидов [6,7]. Поскольку интенсивность метаболизма микроводорослей напрямую зависит от компонентов питательной среды и их концентрации, а также от таких факторов, как освещенность, режим культивирования, температура, рН, концентрация подаваемого углекислого газа, в рамках настоящего исследования был изучен рост штамма *Tetradesmus obliquus* К-08, выделенного из озера города Казани (Республика Татарстан, Российская Федерация).

Чистую культуру микроводорослей *T. obliquus* К-08 получали путем многократного посева и далее поддерживали на агаризованной среде Болда (Bold's basal medium; стандартная среда для культивирования зеленых микроводорослей). Культуру микроводорослей идентифицировали на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена рибулозобисфосфаткарбоксылазы. Анализ секвенированного фрагмента проводили при помощи NCBI BLAST сервера, а также сопоставления с данными BOLD Systems.

Культуру микроводорослей с исходным показателем OD_{750} 0.01 (оптическая плотность при 750 нм) культивировали в стерильном биореакторе Biostat A (Sartorius, Германия) с рабочим объемом 2.0 л. *T. obliquus* К-08 культивировали в биореакторе при следующих параметрах: температурный режим – +28°C, скорость перемешивания среды роста – 100 об мин⁻¹, плотность фотосинтетического фотонного потока – 500 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, концентрация подаваемого углекислого газа – 2.5%, аэрация – 60 л/ч. Образцы для измерения оптической плотности среды, микроскопирования, концентрации пигментов в клетках, измерения рН, определения концентрации ионов в среде культивирования отбирали два раза в день (после световой и темновой фаз), а по окончании экспериментального периода определяли вес сухой биомассы микроводорослей (после сушки при +80°C в течение 24 часов). Содержание пигментов (хлорофилла а, b и каротиноидов) было определено с применением экстракционного метода с использованием диметилсульфоксида (ДМСО). Изменения концентраций нитратов, фосфатов и сульфатов в среде роста измеряли с использованием ионного хроматографа Dionex ICS-900 (Thermo Fisher Scientific), тогда как концентрацию ионов аммония измеряли колориметрическим методом с применением реактива Несслера. Для статистического анализа полученных данных применяли программу Microsoft Excel 2019.

С целью выявления факторов для ускоренного роста и продукции биомассы микроводорослей *T. obliquus* К-08 были поставлены следующие эксперименты: (I) культивирование водорослей в среде Болда со стандартной концентрацией нитратов (180 мг/л), фосфатов (160 мг/л) и сульфатов (35 мг/л); (II) культивирование микроводорослей в среде Болда с повышенной концентрацией нитратов (740 мг/л) и стандартной концентрацией фосфатов (160 мг/л) и сульфатов (35 мг/л); (III) культивирование микроводорослей в нестерилизованном эффлюенте анаэробной конверсии послеспиртовой

барды и жома сахарной свеклы. Изначально отходы спиртового и сахарного производств были подвержены анаэробной конверсии в биогаз с использованием автоматической системы тестирования потенциала метана AMPTS II Light (Bioprocess Control, Швеция), а для инициации анаэробного процесса применяли трансформированный коровий навоз. Перед культивированием полученный анаэробный эффлюент центрифугировали, и разбавленный супернатант (10%) использовали в качестве среды роста. Дополнительно вносили ионы фосфатов и сульфатов ввиду их пониженной концентрации в разбавленном эффлюенте. Среднее содержание ионов аммония в среде культивирования на основе эффлюента в момент инокуляции микроводорослей составило 65 мг/л, в то время как фосфат-ионов – 150 мг/л, а сульфат-ионов – 30 мг/л.

На основе результатов показателей роста, а также содержания пигментов и значений конечной сухой биомассы микроводорослей, наилучший показатель роста штамма *T. obliquus* K-08 был достигнут при культивировании на среде Болда с повышенной концентрацией нитратного азота (значение OD_{750} составило 5.6–5.8, количество клеток $6-7 \times 10^7$ в мл, а концентрация пигментов в клетках достигала 105 мг/мл на 184 час роста). Значения pH в процессе культивирования поднялись с начальных 6.3 до 7.6. Анализ среды с использованием методов ионной хроматографии показал, что количество фосфатов и сульфатов в модифицированной среде Болда было предостаточно на протяжении всего экспериментального периода, тогда как нитраты были полностью утилизированы к концу экспериментального периода. Стоит отметить, что при культивировании микроводорослей *T. obliquus* K-08 в среде Болда со стандартным уровнем нитратов, показатели роста, выход общей биомассы микроводорослей и концентрация пигментов были занижены в сравнении с показателями экспериментов с повышенной концентрацией нитратов в модифицированной среде Болда. Результаты экспериментов с использованием эффлюента в качестве источника питательных веществ показывают, что среда культивирования на основе 10% эффлюента с дополнительным внесением фосфат ионов и сульфат ионов восполняла требования микроводорослей в компонентах среды (источник азота в аммонийной форме), однако скорость роста штамма K-08 была немного ниже в сравнении с экспериментами с модифицированной средой Болда. Значения уровня pH среды культивирования снизились с исходных 7.4 до 7.1 на конец экспериментального периода (на 184 час эксперимента). Результаты анализа основных компонентов среды показали, что количество внесенных фосфатов и сульфатов в среде роста было предостаточно на протяжении всего экспериментального периода, тогда как ионы аммония были полностью утилизированы.

Результаты данного исследования показали необходимость дополнительного внесения нитратов в стандартную среду Болда при фотоавтотрофном режиме культивирования для повышения роста зеленых микроводорослей *Tetradesmus obliquus* K-08, указали на возможность применения разбавленного эффлюента анаэробной конверсии отходов спиртового и сахарного производства с дополнительным внесением источников фосфора и серы при миксотрофном режиме культивирования, так и показали необходимость подбора эффлюента анаэробного процесса и его концентрации, полностью восполняющего требования микроводорослей в источниках и концентрациях основных питательных компонентов среды роста.

Работа выполнена при финансовой поддержке «Российского фонда фундаментальных исследований» в рамках научного проекта № 18-34-20002.

Библиографический список

1. Khan M.I., Shin J.H., Kim J.D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products // *Microbial Cell Factories*. – 2018. – V. 17. – P. 1–21.
2. Saad M.G., Dosoky N.S., Zoromba M.S., Shafik H.M. Algal biofuels: Current status and key challenges // *Energies*. – 2019. – V. 12. – P. 1–22.
3. Nzayisenga J.C., Farge X., Groll S.L., Sellstedt A. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater // *Biotechnology for Biofuels*. – 2020. – V. 13. – P. 1–8.
4. Ziganshina E.E., Bulynina S.S., Ziganshin A.M. Comparison of the photoautotrophic growth regimens of *Chlorella sorokiniana* in a photobioreactor for enhanced biomass productivity // *Biology*. – 2020. – V. 9. – P. 1–13.
5. León-Saikia G.M., Remmers I.M., Martens D.E., Lamers P.P., Wijffels R.H., van der Veen D. The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus* // *Algal Research*. – 2017. – V. 25. – P. 160–167.
6. An M., Gao L., Zhao W., Chen W., Li M. Effects of nitrogen forms and supply mode on lipid production of microalga *Scenedesmus obliquus* // *Energies*. – 2020. – V. 13. – P. 1–13.
7. Qu Z., Duan P., Cao X., Liu M., Lin L., Li M. Comparison of monoculture and mixed culture (*Scenedesmus obliquus* and wild algae) for C, N, and P removal and lipid production // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2019. – V. 26. – P. 20961–20968.

ПРИМЕНЕНИЕ QUERCETIN HYDRATE И TRANS-CINNAMALDEHYDE В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ «QUORUM SENSING» LUXI/LUXR-ТИПА У БАКТЕРИЙ

Инчагова К.С.

*ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий»
Российской академии наук, г. Оренбург, Россия.*

Ключевые слова: quorum sensing, ингибиторы QS, малые молекулы растительного происхождения

На сегодняшний день известно, что «quorum sensing» (QS) участвует в реализации патогенного потенциала бактерий, контролируя синтез факторов вирулентности и биопленкообразование [1]. Данный феномен представляет собой регуляцию экспрессии генов бактерий, функционирующую в условиях критически высокой плотности их популяции [2]. Тот факт, что QS участвует в патогенезе микроорганизмов, делает его привлекательной мишенью для создания антибактериальных средств нового принципа действия, основанных не на прямом угнетении роста патогена, а на изменении его генетического профиля, тем самым обуславливая невозможность бактериальной клетки инфицировать хозяйский организм.

Современная литература обладает большим запасом данных об ингибиторах QS как органической, так и неорганической природы [3, 4], среди которых особое место отведено растительным экстрактам и малым молекулам, идентифицированным в них. Об участии малых молекул растительного происхождения в регуляции QS-зависимых процессов в бактериальной клетке на сегодняшний день представлено достаточно много данных [5, 6]. Однако интерес к подобным веществам остается до конца неисчерпанным, поскольку многие из них являются токсичными в отношении человека и животных [7, 8].

В этой связи, целью настоящего исследования стало изучение влияния quercetin hydrate и trans-cinnamaldehyde на «quorum sensing» LuxI/LuxR-типа у *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532.

Исследование проводилось в два этапа. Первый включал тестирование quercetin hydrate (кверцетина) и trans-cinnamaldehyde (коричного альдегида) на наличие рост- и QS-ингибирующей активностей в отношении виолацеин-продуцирующего штамма *C. violaceum* ATCC 31532, характеризующегося способностью к образованию пигмента, синтез которого запускается в присутствии синтезируемого этим же микроорганизмом C₆-АГЛ [9]. Второй этап подразумевал совместное использование кверцетина и коричневого альдегида с целью усиления выявленных на первом этапе эффектов.

На первом этапе для определения QS-ингибирующей активности исследуемых веществ готовили двукратные разведения малых молекул в LB-бульоне («Sigma», США). Соответствующие объемы LB-бульона, не содержащие названных компонентов, использовали в качестве положительного (рост тест-штамма) и отрицательного (стерильного) контролей. Далее ячейки инокулировались *C. violaceum* ATCC 31532 и инкубировались при 27°C в течение 24-48 часов для проявления роста бактериальной культуры с достижением QS-эффекта, оцениваемого по образованию экстрагируемого из бактериальной биомассы сине-фиолетового пигмента виолацеина.

Проведенный анализ показал отсутствие рост-ингибирующего эффекта у кверцетина, и напротив, его наличие у коричневого альдегида. Одновременно оба соединения характеризовались выраженным QS-ингибирующим действием в отношении тест-штамма.

Второй этап исследования включал оценку совместного действия малых молекул растительного происхождения, целью которого являлось усиление выявленного QS-ингибирующего эффекта кверцетина и коричневого альдегида. Для этого в пластиковые 96-луночные планшеты вносили двукратные разведения тестируемых соединений в перпендикулярных друг другу направлениях, так что в каждой из ячеек формировалось индивидуальное соотношение «кверцетин : коричный альдегид». Пробами сравнения являлись ряды разведений, содержащие только одно из тестируемых соединений, а также положительный и отрицательный контроли. Дальнейшие инокуляции *C. violaceum* ATCC 31532, культивирование и учет результатов исследования проводили, как описано выше.

В ходе исследования было выявлено, что сочетанное использование композиции кверцетина и коричневого альдегида приводило к выраженному усилению QS-ингибирующей активности в отношении *C. violaceum* ATCC 31532, и характеризовалось снижением концентраций каждого из соединений в 2-19 раз для кверцетина и 1,5-10 раз для коричневого альдегида.

Полученные в ходе исследования результаты составляют основу для тестирования представленной композиции малых молекул растительного происхождения в качестве потенциального антибактериального средства, нацеленного на угнетение бактериального патогена через ингибирование его QS-систем. С другой стороны, экологическим аспектом полученных результатов является отражение взаимоотношений «бактерия – растение», где малые молекулы являются неким «оружием» для борьбы с бактериальными патогенами, с которыми растения сталкиваются в естественных условиях окружающей среды.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 16-16-10048).

Библиографический список

1. Defoirdt T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy // Trends Microbiol. – 2018. – V. 26. – №. 4. – P. 313-328.
2. Hawver L.A., Jung S.A., Ng W.-L. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems // FEMS Microbiol. Rev. – 2016. – V. 40. – P. 738-752.

3. Remy B., Mion S., Plener L., Elias M., Chabriere E., Daude D. Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective // *Front. Pharmacol.* – 2018. – V. 9. – № 203. – P. 1-17.
4. Jakobsen T.H., Alhede M., Hultqvist L.D., Bjarnsholt T., Givskov M. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro* // *Quorum Sensing.* – 2018. – V. 1673. – P. 275-285.
5. Berde C.V., Salvi S.P., Rawool P.P., Prathyusha A.M.V.N., Berde V.B. Role of Medicinal Plants and Endophytic Bacteria of Medicinal Plants in Inhibition of Biofilm Formation: Interference in Quorum Sensing // *Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry.* – 2019. – P. 177-188.
6. Deryabin D., Galadzhieva A., Kosyan D., Duskaev G. Plant-derived inhibitors of AHL-mediated quorum sensing in bacteria: Modes of action // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20. – № 22. – P. 5588.
7. Thooptianrat T., Chaveerach A., Sudmoon R., Tanee T., Liehr T., Babayan N. Screening of phytochemicals and toxicity of medicinal plants, *Dillenia species*, reveals potential natural product resources // *J Food Biochem.* – 2017. – V. 41. – № 3. – P. e12363.
8. Devillers J., Devillers H. Toxicity profiling and prioritization of plant-derived antimalarial agents // *SAR QSAR Environ Res.* – 2019. – V. 30. – № 11. – P. 801-824.
9. Stauff D.L., Bassler B.L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor // *J Bacteriol.* – 2011. – V. 193. – P. 3871-3878.

**К ФАУНЕ ГЕРПЕТОБИНТНЫХ ПАУКОВ (ARANEI) СОСНОВЫХ
ЛЕСОПОСАДОК ПУСТЫННОЙ ЗОНА ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ**
Кабдрахимов А.А.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: пауки, фауна, пустынная зона, лесопосадки, Казахстан

Создание искусственных лесных насаждений из широколиственных пород приводит к коренной перестройке животного населения полупустынь в северной части Прикаспийской низменности. Многолетние исследования, проводящиеся на Джаныбекском стационаре с середины 20 века, показали в 16-летних искусственно созданных лесопосадках количество почвенных беспозвоночных очень мало и среди них преобладают сапрофаги, в отличие от полупустынь, где доминировали фитофаги [1]. Новый комплекс беспозвоночных формируется за счет рудеральных видов. В средневозрастных лесопосадках, по данным Т.С. Всеволодовой-Перель с соавторами [4], численность почвенных беспозвоночных (мезофауна) увеличивается, а их состав становится более разнообразным, что связано с внедрением видов, характерных для лесных почв. Массовые же в целинных почвах виды исчезают.

С другой стороны, в лесопосадках обнаруживается много герпетобионтов, которые также встречаются в целинных степях. Например, жужелицы представлены в лесонасаждениях в основном полизональными видами, а лесных жуки используют их как место переживания зимних условий [3].

Видовой состав пауков в лесных насаждениях очень разнообразен, однако они относятся к широко распространенным полизональным видам, которые не встречаются в степи [7].

Сосновые лесопосадки в районе посёлка Хан Ордасы в Западно-Казахстанской области появились по указу Александра III, когда было организовано Нарынское лесничество (март 1890 г.) на местах, выделенных для лесовыращивания еще в первой половине XIX века последних казахских ханов Жангира. Жангир начал выращивать леса для того, что бы защитить Нарынскую котловину от надвигающихся песков. Сегодня сохранением и воспроизводством лесов занимается Урдинское государственное учреждение по охране лесов и животного мира.

Задача нашего исследования – проанализировать закономерности фауны пауков светлохвойных лесопосадок в условиях полупустыни западного Казахстана.

В сентябре 2019 г. мы провели предварительное исследование фауны пауков сосновых лесопосадок, возрастом 130 лет, в районе посёлка Хан Ордасы (48,769722° с.ш., 47,428333° в.д.), Бокейординский район Западно-Казахстанской области. Материалы были собраны методом почвенных ловушек. Пойменные пауки представлены 7 вида. Пять видов представленные половозрелыми особями определены до вида. Ниже мы приводим аннотированный список обнаруженных видов.

Coreodrassus semidesertus Ponomarev et Tsvetkov, 2006 описан из Атырауской области Казахстана, где он обитает в степях и на песчаных валах в пойме р. Урал (А.В. Пономарев, личное сообщение).

Gnaphosa mongolica Simon, 1895 встречается от Венгрии на западе (до восточного Китая по аридным зонам. Вид заселяет остепненные склоны, песчаные степи, солончаки, меловых и гранитных обнажений [12].

Bogdocosa kronebergi (Andreeva, 1976) распространена от Ирана и Дагестана до западного Китая. В северном Прикаспии найден на берегу озера в тамарисковой полынной степи и лесополосе из ильма [11].

Xysticus acerbus Thorell, 1872 распространен от Европы до Центральной Азии. В Европе отмечен на солнечных и сухих лугах и пустошах. На юге Восточноевропейской равнины обитает на суходольных луга, в различных степях, на каменистых склонах и меловых обнажениях [12].

Xysticus lapidarius Utochkin, 1968 известен из Казахстана, Туркменистана и Таджикистана. Данные о биотопической приуроченности почти отсутствуют; а Прикаспии пойман на песках [10].

Не смотря на предварительный характер результатов уже сейчас можно отметить, что за исключением одного вида (*X. acerbus*) все имеют центрально-азиатское распространение и приурочены к степным биотопам и все без исключений виды - типичные обитатели ксероморфных биотопов.

Таким образом, из наших предварительных данных следует, что фауна пауков светлохвойных лесонасаждений в полупустынях западного Казахстана отличается от фауны широколиственных лесопосадок. По-видимому, исследованные нами лесопосадки уникальны и не имеют аналогов в других регионах. Так группировки пауков лесополос степной зоны Украины значительно отличается от таковых целинных степей: они имеют минимальное видовой разнообразие в агроландшафте; среди доминантных видов присутствуют лесные виды [8]. Нам известна только одна работа, в которой отмечается, что фауна лесополос на севере Минусинской котловины формируется за счет степных видов [6].

Известно так же, что на состав фауны беспозвоночных может влиять размер лесонасаждений. Так, на примере насекомых лесополос степной зоны Волгоградской области показано, что в узких (двурядных полосах) преобладают степные виды, а в широких – лесные виды [2]. Такие же закономерности получены для герпетобионтных

насекомых полупустынных ландшафтов юга европейской части России (Утянская, 1986; Черезова, 1987, цит. по [6]). В Оренбургской области в фауне жужелиц много лесных видов, но отмечается проникновение степных видов [9]. Эти авторы обнаружили, что в сосновых лесонасаждениях степных видов больше, чем в лесонасаждениях с участием лиственных пород.

Пользуясь случаем выражаю благодарность С.Л. Есюнину за ценные рекомендации и помощь в редактировании текста.

Библиографический список

1. Арнольди К.В., Перель Т.С., Шарова И.Х. Влияние искусственных лесных насаждений на почвенных беспозвоночных глинистых полупустынь // Животные искусственных лесных насаждений в глинистой полупустыне. - М.: Наука. - 1971. - С.34-54.

2. Белицкая М.Н., Нефедьева Е.Э., Макеев А.А., Жидкоблинов С.П. Биоразнообразие и экологическая структура напочвенных жестокрылых в защитных лесных насаждениях // Вестник технологического университета. - 2015. - Т. 18. - № 2. - С. 416-419.

3. Всеволодова-Перель Т.С. Формирование населения почвенных беспозвоночных (мезофауны) в лесных насаждениях комплексной полупустыни Прикаспия // Зоологический журнал. – 2006. – Т. 85. - № 11. – С. 1327-1332.

4. Всеволодова-Перель Т.С., Сиземская М.Л., Колесников А.В. Изменение видового состава и трофической структуры почвенного населения при создании искусственных лесных насаждений в полупустыне Прикаспия // Поволжский экологический журнал – № 2. 2010. С. 142-150.

5. Зуев Р.В., Сигида С.И. Биотопическая приуроченность Chilopoda и Diplopoda фауны Центрального Предкавказья // Наука. Инновации. Технологии. - 2018. - № 3. - С. 141-154.

6. Майманакова И.Л., Анюшин В.В., Баранчиков Ю.Н. Сходство комплексов насекомых-герпетобионтов лесополос и залежей на севере Минусинской котловины // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. - 2019. - № 4. - С. 84-88.

7. Питеркина Т.В., Михайлов К.Г. Аннотированный список пауков (Aranei) Джаныбекского стационара // Животные глинистой полупустыни Заволжья (конспекты фаун и экологические характеристики). – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2009. – С. 62-88.

8. Прокопенко Е. В., Савченко Е. Ю. Пауки (Aranei) агроценозов Донецкой области // Проблемы экологии и охраны природы техногенного региона. – 2013. – № 1(13). - С. 122-133.

9. Сафонов М.А., Маленкова А.С., Русаков А.В., Ленева Е.А. Биота искусственных лесов Оренбургского Предуралья. - Оренбург: Университет, 2013. - 176 с.

10. Цветков А.С., Пономарев А.В. 2006. Дополнение к фауне пауков (Aranei) Северного Прикаспия // Кавказский энтомологический бюллетень. - 2006. - Т. 2, № 2. - С. 165-166

11. Esyunin S.L., Ponomarev A.V. Taxonomic remarks on the genus *Bogdocosa* Ponomarev et Belosludtsev, 2008 (Aranei: Lycosidae) // Arthropoda Selecta. - 2018. - Vol.27. - № 1. - P.61–68.

12. Polchaninova N.Yu., Prokopenko E.V. Catalogue of the spiders (Arachnida, Aranei) of Left-Bank Ukraine // Arthropoda Selecta. - 2015. - Supplement № 2. – P. 1-268.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА 2 НА ФУНКЦИИ МОНОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Кадочникова Я.А.

«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Научный руководитель: зам. директора ИЭГМ УрО РАН по научной работе, д.м.н., профессор Гейн С.В.

Ключевые слова: эндогенная опиоидная система, эндоморфины, активные формы кислорода, фагоцитоз, лейкоциты

Опиоидные пептиды представляют собой большую группу физиологически активных пептидов с выраженным сродством к рецепторам опиоидного (морфинного) типа. Для μ -опиоидных рецепторов эндогенными агонистами преимущественно являются бета-эндорфин, эндоморфины; для δ – мет- и лей-энкефалины; динорфин преимущественно связывается с κ -опиоидными рецепторами. В литературе наиболее подробно описано иммуномодулирующее действие трех основных семейств опиоидных пептидов – эндорфинов, энкефалинов, динорфинов, образующихся в ходе последовательного протеолитического гидролиза из крупных молекул-предшественников (проопиомеланокортин, продинорфины, проэнкефалин). Гораздо меньше информации известно об иммуномодулирующих эффектах эндоморфинов, эндогенный предшественник которых все еще не идентифицирован [1, 4, 5].

Эндогенные опиоидные пептиды обладают широким спектром регуляторной активности, проявляя антиинфекционное и стресс-лимитирующее воздействие, также они принимают участие в регуляции многих других физиологических функций, в том числе иммунитета [1, 2, 3].

Цель настоящей работы – исследование влияния эндогенного опиоидного пептида эндоморфина 2 на функциональную активность моноцитов и нейтрофилов периферической крови *in vitro*.

Материалы и методы. Объектом исследований служила венозная кровь здоровых доноров-добровольцев в возрасте от 22 до 40 лет. Все эксперименты проведены с соблюдением этических норм. Диапазон исследуемых концентраций эндоморфина 2: $10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10}, 10^{-12}$ М.

Гепаринизированную венозную кровь помещали в термостат на 2 ч. при 37°C для получения фракции лейкоцитов. Получившуюся в ходе отстаивания плазму центрифугировали в течение 20 мин при 1500 об/мин. Для получения нейтрофильной фракции плазму аккуратно наслаивали на градиент плотности фиколл-урографин ($\rho=1,077$) и центрифугировали в течение 40 мин при 1500 об/мин. После центрифугирования полученную клеточную суспензию выдерживали 1 ч при 4°C в полной питательной среде для предотвращения активации. Продукцию АФК определяли с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл, в качестве маркера выраженности реакции использовался люминол (10^{-5} М). Регистрацию результатов проводили в течение 1 ч с интервалом в 5 минут с помощью спектрофотометра ТЕСАН (Австрия).

Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови на одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho=1,077$). Для получения моноцитов мононуклеары помещали на чашку Петри в полную питательную среду на 1 ч в термостат

при 37⁰С для адгезии моноцитов к стеклу, которые после снимали резиновым шпателем. Продукцию IL-1 β и IL-10 мононуклеарами и моноцитами определяли в 24 часовых культур супернатантов с помощью тест систем «ВЕКТОР-БЕСТ» (Новосибирск). В качестве индуктора реакции использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл.

Оценку влияния эндоморфина 2 на поглотительную активность нейтрофилов и моноцитов проводили с помощью метода проточной цитометрии на приборе BD FACSCalibur. В качестве объекта фагоцитоза использовали FITC-меченые *St. aureus* (предварительно разводили в соотношении 1:10).

Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ и парный LSD-критерий. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

На основе проведенных исследований были получены следующие результаты. Внесение в культуры эндоморфина 2 во всем диапазоне исследуемых концентраций приводило к снижению спонтанной продукции АФК фракцией лейкоцитов. Стимулированная зимозаном продукция АФК под влиянием пептида статистически значимо не изменялась. При оценке влияния эндоморфина 2 на кислородзависимую микробицидную активность нейтрофилов было установлено, что пептид в концентрациях 10^{-8} , 10^{-10} М значительно усиливал выработку АФК нейтрофилами (рис.1). Также эндоморфин 2 во всем диапазоне исследуемых концентраций показал выраженное снижение индуцированной зимозаном продукции АФК (рис.2).

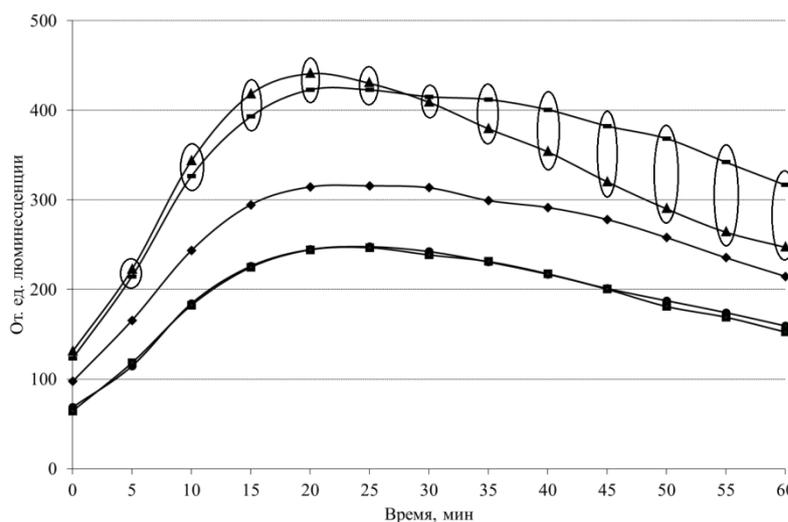


Рис. 1. Влияние эндоморфина 2 на спонтанную продукцию активных форм кислорода фракцией нейтрофилов периферической крови.

● - контроль; ■ – 10^{-6} ; ▲ – 10^{-8} ; ◻ – 10^{-10} ; • – 10^{-12} ; $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Оценка влияния эндоморфина 2 на продукцию IL-1 β и IL-10 клетками периферической крови показала, что пептид статистически значимых изменений на спонтанную продукцию цитокинов мононуклеарами и макрофагами не оказывал. На индуцированную зимозаном продукцию IL-1 β эндоморфин 2 также существенного влияния не оказывал, однако внесение пептида в стимулированные культуры мононуклеаров снижало выработку IL-10 (рис.3).

При оценке влияния пептида на поглотительную активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови было установлено, что эндоморфин 2 в концентрациях 10^{-6} , 10^{-10} М увеличивал процент фагоцитоза нейтрофилов. Поглотительную активность моноцитов пептид усиливал во всем диапазоне исследуемых концентраций.

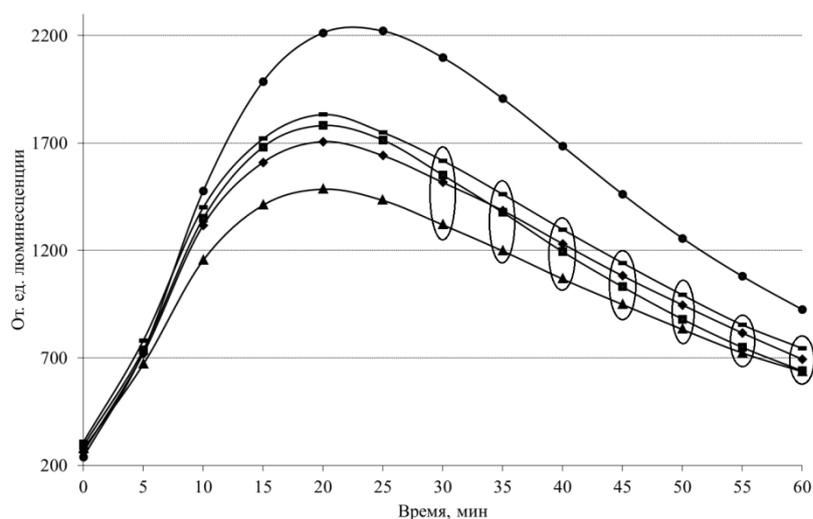


Рис. 2. Влияние эндоморфина 2 на индуцированную зимозаном продукцию активных форм кислорода фракцией нейтрофилов периферической крови. ● - контроль; ■ – 10^{-6} ; ▲ – 10^{-8} ; — – 10^{-10} ; • – 10^{-12} ; $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таким образом, на основе полученных результатов можно сказать, что эндоморфин 2 оказывает разнонаправленное действие на функции клеток врожденного иммунитета. Направленность воздействия эндоморфинов, как и других регуляторных пептидов, зависит от вводимой дозы, состава клеточной фракции и от наличия дополнительного активационного стимула.

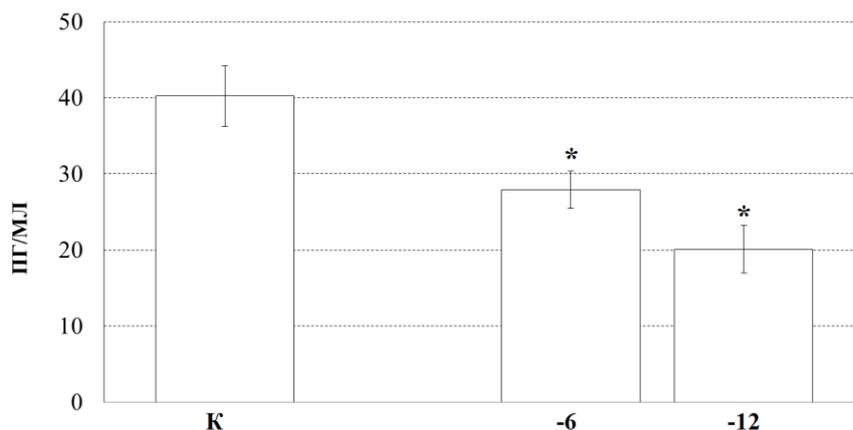


Рис. 3. Влияние эндоморфина 2 на индуцированную зимозаном продукцию IL-10 мононуклеарами. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А19-119112290007-7.

Библиографический список

1. Гейн С.В., Баева Т.А. Эндогенные опиоидные пептиды в регуляции функций клеток врожденного иммунитета // Биохимия. – 2011. – Т. 76. – № 3. – С. 379 – 390.
2. Горшкова К.Г. Опиоидные пептиды в регуляции функций эффекторов врожденного иммунитета: дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург. – 2012. 120 с.
3. Bodnar R.J. Endogenous opiates and behavior // Peptides. – 2010. – V. 31. – P. 2325-2359.
4. Mizusawa K. Endomorphin. In: Takei Y, Ando H, Tsutsui K, ed. Handbook of hormones: comparative endocrinology for basic and clinical research // Oxford: Academic Press. – 2016. – P. 62–63.

5. Pomorska D.K., Gach K., Janecka A.. Immunomodulatory effects of endogenous and synthetic peptides activating opioid receptors. // Mini-Reviews in Medicinal chemistry. – 2014. – №14. – P.1148-1155.

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ *LACTOBACILLUS* ПРОТИВ *MORGANELLA MORGANII*

Карасева О.С., Юдина Ю.Ю., Яруллина Д.Р.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра микробиологии, 4200008 Казань, ул. Кремлевская, 18

Ключевые слова: лактобациллы, антагонистическая активность, пробиотики

Бактерии *Morganella morganii* обычно присутствуют в окружающей среде и в кишечнике человека как комменсальный организм, а также считаются серьезным возбудителем внутрибольничных инфекций, в том числе и смертельно опасных [1]. В некоторых случаях они могут выступать в качестве оппортунистического патогена, вызывая инфекции у пациентов в послеоперационном периоде с ослабленным иммунитетом или при антибиотикотерапии, что актуализирует поиск антагонистически активных пробиотиков для использования в качестве альтернативной или адьювантной терапии [2].

Данные об антагонистической активности *Lactobacillus* в отношении *M. morganii* очень ограничены. Ингибирующий эффект нейтрализованных бесклеточных супернатантов был найден у штамма *Lactobacillus sp.* TGR-2, выделенный из гроуола (ферментированной сырой маниоки) [3], а также у четырех штаммов *Lactobacillus*, выделенных из молока и молочных продуктов [4], что свидетельствует об их способности продуцировать бактериоцины, эффективные против *M. morganii*. Целью данной работы является поиск лактобацилл, способных подавлять рост бактерий *M. morganii*, и выяснение природы их антагонистических взаимоотношений.

В работе использовали 12 штаммов лактобацилл, выделенных из растительного сырья и кишечника человека. Антагонистическую активность лактобацилл против *M. morganii* оценивали методом «пятна на агаре», в котором бактерии совместно инкубируются на чашках Петри [5]. В проведенном эксперименте все исследованные лактобациллы проявляли способность ингибировать рост *M. morganii* MM190. Штамм FCa8L из растительного сырья обладал наибольшим антагонистическим действием против *M. morganii*. При этом продукция молочной кислоты, измеренная методом титрования, практически не отличалась у исследованных штаммов *Lactobacillus*. Белковые фракции, полученные методом высаливания сульфатом аммония из культуральной жидкости штаммов лактобацилл, ингибировали рост культуры *M. morganii*. Следовательно, у исследованных штаммов *Lactobacillus* выявлена способность образовывать бактериоцины, эффективные против *M. morganii*. Однако, в условиях модифицированного метода «пятна на агаре», в котором бактерии выращивали на MRS-агаре с содержанием глюкозы 0.2%, что не позволяло лактобациллам осуществлять метаболизм бродильного типа и продуцировать лактат и другие продукты молочнокислого брожения [5], концентрация бактериоцинов была недостаточной для подавления роста *M. morganii* (таблица 1).

В естественных местообитаниях микроорганизмы редко существуют как планктонные формы одного вида, а развиваются в сложных полимикробных биопленочных сообществах [6].

Таблица 1

Характеристика антагонистических свойств лактобацилл

№	Штамм Lactobacillus	Источник выделения	Антагонистическая активность против <i>M. morganii</i> MM190, мм	Продукция бактериоцинов	Кислотообразование	
					Органические кислоты, мМ/г	NaOH / ОП ₆₀₀
1.	LR-1	Участок нисходящей ободочной кишки пациента (женщина, 40 лет) с хроническим колостазом в стадии декомпенсации, долихоколоном, синдромом Пайра	8.0±0.0	+	1.12±0.07	0.29±0.03
2.	LR-2.7	Биоптаты толстой кишки от пациентов, прооперированных по поводу дивертикулярной болезни, необтурирующих просвет ободочной кишки злокачественных и доброкачественных опухолей	8.5±0.7	+	1.10±0.09	0.26±0.09
3.	LS-2.1		8.5±0.5	+	1.48±0.10	0.35±0.07
4.	LS-1.2.1		7.5±0.7	НД	0.93±0.02	0.28±0.02
9.	LS-4.4		8.5±0.0	+	1.42±0.18	0.27±0.03
6.	HF-C1	Фекалии клинически здоровой женщины, 26 лет	7.5±0.0	+	0.93±0.03	0.23±0.00
7.	HF-D1	Фекалии клинически здоровой женщины, 27 лет	7.0±0.7	+	1.37±0.13	0.36±0.05
8.	HF-E1	Фекалии клинически здорового мужчины, 35 лет	7.5±0.5	+	1.50±0.15	0.23±0.01
5.	HF-F3	Фекалии клинически здоровой женщины, 26 лет	7.5±0.5	+	0.97±0.02	0.31±0.03
10.	FCa1L	Квашеная капуста (FCa - от англ. Fermented cabbage)	8.0±0.5	+	1.54±0.15	0.31±0.01
11.	FCa3L		8.5±0.0	+	1.46±0.15	0.30±0.02
12.	FCa8L		8.5±0.7	+	1.04±0.09	0.21±0.03

НД – нет данных

Поэтому далее мы оценили способность лактобацилл ингибировать рост *M. morganii* в составе смешанной биопленки. Образование биопленок оценивали по степени связывания

ими кристаллического фиолетового. Численность бактерий в составе биопленки и в планктонной фазе определяли, высевая их на соответствующие плотные питательные среды и подсчитывая колонии. У четырех штаммов лактобацилл (LS-2.1, FCa8L, HF-D1, LS-4.4) при совместном культивировании с *M. morgani* обнаружили способность угнетать рост и развитие *M. morgani* в составе смешанной биопленки, но не в планктонной фазе. При этом численность лактобацилл снижалась по сравнению с выращиванием в монокультуре.

Таким образом, в ходе работы были отобраны штаммы, подавляющие клинические изоляты *M. morgani*, и установлен вклад закисления среды и бактериоцинов в регистрируемую антагонистическую активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект РФФИ-17-00-00456) в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ.

Библиографический список

1. Lee Ing-Kit, Liu Jien-Wei Characteristics and risk factors for mortality in *Morganella morgani* bacteremia [Text] / Ing-Kit Lee, Jien-Wei Liu // J Microbiol Immunol Infec. -2006. –V. 16. –P. 68-70
2. Smithson A.A. Osteomyelitis of the rib due to *Morganella morgani* [Text] / A.A. Smithson, R.P. Carbonell, L.R. Arenillas, A.S. Viladomiu // An Med Interna. – 2004. – P. 57-64.
3. Djaafar T. Antimicrobial substance produced by *Lactobacillus* TGR-2 isolated from growol [Text] / T. Djaafar, E.S. Rahayu, D. Wibowo // Food Nutr.Prog. Indones. – 1996. –V. 3 (2). –P. 29–34.
4. Abdulla A.A. Adhesion autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains [Text] / A.A. Abdulla, T.A. Abed, A.M. Saeed // Br Microbiol Res J. – 2014. –V. 4(4). -P. 381-391
5. Schillinger U. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat [Text] / Schillinger U., Lücke F.K. // Appl Environ Microbiol. –1989. –V. 13 (1). – P. 1-10.
6. Petersa, B.M. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease [Text] / B.M. Petersa, M.A. Jabra-Rizkc, G. A. O'Mayb, J. W. Costertone and M. E. Shirtliffb // Clin. Microbiol. Rev. -2012. -V. 25. – P.193-213.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ИЗ СЕМЕЙСТВА PPAR У ДЗЮДОИСТОВ Г. ПЕРМИ

Кардакова В.М.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
Пермь, РФ

Научный руководитель: д.б.н., профессор Боронникова С.В.

Ключевые слова: гены, полиморфизм ДНК, *PPARG*, *PPARGC1A*, дзюдо.

Известно около 140 генов, полиморфизмы которых ассоциированы со спортивной деятельностью. Необходимость исследования генотипов спортсменов является обоснованной, так как их высокая физическая активность в сочетании с физическими упражнениями различной направленности позволяет с большой вероятностью выделить генетические детерминанты, определяющие развитие какой-либо характеристики [1]. Согласно классификации, дзюдо является ациклическим видом спорта [2], который отличается широким спектром разноплановых физических нагрузок, где крайне важны такие качества как скорость, сила, общая выносливость. Контроль метаболических

процессов при мышечной деятельности происходит под контролем генов семейства *PPAR* – *peroxisome proliferator-activated receptor*, отвечающих за регуляцию липидного обмена [3]. Для формирования необходимых физических качеств у дзюдоистов важно учитывать полиморфизм гена *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptors gamma*), который ассоциируется с качеством «скорость/сила», а также полиморфизм гена *PPARGC1A* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), который устанавливает предрасположенность к проявлению выносливости [4]. Цель исследования – определить аллельные варианты генов *PPARG* и *PPARGC1A* и на их основе выявить генетическую предрасположенность к развитию физических качеств у дзюдоистов двух спортивных школ г. Перми.

Образцы буккального эпителия из ротовой полости собраны у 41 спортсмена, занимающегося дзюдо в МАУ «СШОР по дзюдо и самбо» г. Перми, а также у 70 спортсменов из школы МБУ «Спортивная школа олимпийского резерва по самбо и дзюдо «Витязь» имени И. И. Пономарева» г. Перми; все лица мужского пола в возрасте от 12 до 16 лет.

ДНК выделяли сорбентным методом с помощью коммерческого набора «Проба ГС». Для амплификации фрагментов ДНК генов *PPARG* и *PPARGC1A*, содержащих полиморфные локусы, использовали методики из литературных источников [5]. Для разделения фрагментов ампликоны инкубировали вместе с эндонуклеазами рестрикции — *Bsh1236I* и *MspI* для гена *PPARG* и *PPARGC1A* соответственно. Продукты рестрикции генов *PPARG* и *PPARGC1A* фракционировали посредством электрофореза в 2% агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием и фотографированием с помощью системы гель-документации Gel Doc XR в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длины фрагментов использовали маркер молекулярной массы (50 bp +1.5 + 3 Kb DNA Ladder) с использованием программы Quantity One 4.6.2.

Аллельные варианты гена *PPARG* могут формировать 3 генотипа: гомозиготу Ala/Ala при выявлении одного фрагмента ДНК длиной 257 п.н. У спортсменов с таким генотипом мышцы имеют высокую чувствительность к инсулину, который усиливает анаболическое действие на скелетные мышцы, благодаря чему этот генотип является наиболее благоприятным для развития скоростно-силовых качеств спортсменов. Гетерозиготе Ala/Pro соответствуют три фрагмента ДНК (257, 223 и 34 п.н.). У спортсменов с этим генотипом средняя чувствительность к инсулину, что приводит к снижению мышечной деятельности. Третий генотип Pro/Pro выявлен по наличию двух фрагментов ДНК (223 и 34 п.н.). Он ассоциируется с низкой физической работоспособностью, благодаря пониженной чувствительности к инсулину в медленных и в быстрых мышечных волокнах. Этот генотип относится к наименее благоприятному генотипу для проявления скоростно-силовых качеств. Анализ полиморфизма гена *PPARG* у 41 дзюдоиста выявил генотип Ala/Ala у 29 человек с частотой 0,71; Ala/Pro у 12 спортсменов с частотой 0,29. Генотип Pro/Pro в исследуемой выборке дзюдоистов отсутствовал.

Аллельные варианты гена *PPARGC1A* формируют 3 генотипа: Gly/Gly, для которого характерны два фрагмента ДНК длиной 169 и 209 п.н. и при котором наблюдается увеличенное число митохондрий в клетках и усиление окисления жирных кислот, благоприятствующие развитию выносливости. Второй генотип Ser/Ser, при котором отмечается пониженное число митохондрий в клетках и средний уровень окисления жирных кислот. Этот генотип определяется по одному фрагменту ДНК длиной 378 п.н. и является наименее благоприятным генотипом к проявлению качества «выносливость». Третий генотип Gly/Ser с тремя аллелями (378, 209, 169 п.н.), которому соответствуют среднее число митохондрий в клетках и средний уровень окисления жирных кислот. Анализ

полиморфизма гена *PPARGC1A* у 70 дзюдоистов выявил генотип Gly/Gly у 62 человек с частотой 0,89; Ser/Gly у 7 спортсменов с частотой 0,10; Ser/Ser у 1 дзюдоиста с частотой 0,01.

Таким образом, при анализе полиморфизма гена *PPARG* у 41 дзюдоиста МАУ «СШОР по дзюдо и самбо» г. Перми выявлено два генотипа из трех возможных с преобладанием благоприятного для развития скоростно-силовых качеств гомозиготного генотипа Ala/Ala с частотой 0,71 над менее благоприятным гетерозиготным генотипом Ala/Pro с частотой 0,29. В обследованной выборке дзюдоистов не был выявлен наименее благоприятный гомозиготный генотип Pro/Pro.

При анализе аллельных вариантов гена *PPARGC1A*, ассоциированного с качеством «выносливость», у 70 дзюдоистов МБУ «Спортивная школа олимпийского резерва по самбо и дзюдо «Витязь» имени И. И. Пономарева» г. Перми выявлено три генотипа с преобладанием благоприятного для развития выносливости гомозиготного генотипа Gly/Gly с частотой 0,89, а гетерозиготный генотип Gly/Ser и наименее благоприятный гомозиготный генотип Ser/Ser отмечены с наименьшими частотами – 0,10 и 0,01 соответственно.

Для каждого спортсмена были составлены Индивидуальные отчеты по генотипированию и разработаны рекомендации по корректировке тренировочного процесса на основании молекулярно-генетического анализа полиморфных вариантов генов *PPARG* и *PPARGC1A* дзюдоистов.

Библиографический список

1. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта: состояние и перспективы // Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта. 2007. Т. 4, вып. 5. С. 87-103.
2. Матвеев Л.П. Основы общей теории спорта и системы подготовки спортсменов / Л.П. Матвеев. Киев: Олимпийская литература, 1999. 318 с.
3. Козырев А. В., Ахметов И. И., Цебржинский О. И. Гены семейства ядерных рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом и предрасположенность к занятиям академической греблей // Вестник спортивной науки. 2012. №4. С.35-36.
4. Rankinen T., Bray M.S., Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2005 update // Med. Sci. Sports Exerc. – 2006. – V.38. №11. – P. 1863-1888.
5. Eynon N., Meckel Y., Sagiv M., Yamin C. Do *PPARGC1A* and *PPARα* polymorphisms influence sprint or endurance phenotypes? // Scandinavian journal of medicine & science in sports. – 2010. – V. 20. – №1. – P. 145-150.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ В УСЛОВИЯХ СТАЦИОНАРА

Каримова Н.В.¹, Гизатуллина Ю.С.¹, Дубенкова Д.Д.², Кузнецова М.В.¹

¹ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: уропатогенные *E. coli* (UPEC), устойчивость, антибиотики, антисептики.

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) являются одними из самых распространенных заболеваний во всем мире. Ведущая роль в развитии ИМВП отводится

уропатогенной *Escherichia coli* (UPEC) – её доля в спектре возбудителей урологических инфекций может составлять от 30% до 85% [2].

Резистентность бактерий к антимикробным препаратам, применяемым в современной медицинской практике, значительно возросла в последние годы, особенно это касается микроорганизмов, вызывающих инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. В странах Европы доля штаммов UPEC, нечувствительных к триметоприм-сульфаметоксазолу, – препарату выбора при лечении неосложненных ИМВП, колеблется от 14,6% до 60% [3], к фторхинолонам – от 8 до 48%, к цефалоспорином третьего поколения – от 3 до 43% [2]. Рафальским В.В. (2018) опубликованы обобщённые данные российских многоцентровых эпидемиологических исследований по изучению этиологии различных форм ИМВП и чувствительности возбудителей к антибиотикам, в которых показано, что в России наблюдается стабильно высокая частота выделения изолятов *E. coli*, резистентных к ампициллину (33,1%-41,5%) и ко-тримоксазолу (19,3%-26,2%), а для нефторированных и фторированных хинолонов характерен рост доли нечувствительных штаммов [4].

Проблема устойчивости микроорганизмов существует не только в отношении антибиотиков, но и препаратов, направленных на обеззараживание кожных покровов и/или абиотических поверхностей [5]. Результаты некоторых исследований доказывают возможность формирования приобретенной устойчивости к биоцидным средствам клиническими изолятами в течение одной-трех недель [6]. Кроме того, всё больший интерес вызывает проблема распространения сочетанной устойчивости к антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам среди различных видов микроорганизмов [7, 8].

Цель исследования – оценить уровень устойчивости уropатогенных штаммов *E. coli* к антибактериальным препаратам.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись клинические изоляты *E. coli* (n=93), выделенные от пациентов с ИМВП, находившихся на стационарном лечении в медицинских организациях г. Перми в 2017 г. Генетическое типирование культур осуществляли посредством rep-ПЦР с праймерами ERIC1R/ERIC2 (5'-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA/5'-AAGTAAGTGA CTGGGGTGAGCG), используя соответствующий режим реакции [9].

Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом (МАКМАХ, версия-2018-03). Продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) детектировали с помощью метода «двойных дисков», согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04. Оценку бактериостатического (МПК) и бактерицидного (МБК) действия антисептических растворов мирамистина («Мирамистин»[®] 0,01%, ООО «ИНФАМЕД К», Россия) и хлоргексидина биглюконата («Водный раствор хлоргексидина биглюконата» 0,05%, ОАО «Самарамедпром», Россия) проводили в планктонной культуре стандартными методами.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программы STATISTICA v.10. Для выявления статистически значимых различий определяли точный критерий Фишера (*F*-test) и критерий Уилкоксона (*W*-test), для оценки силы связи использовали коэффициент Спирмана (*rs*). Все результаты оценивали при уровне достоверности $p < 0,05$.

Результаты. Проведенное молекулярное типирование UPEC показало, что 69,9% культур имели индивидуальные ERIC-профили, а 30,1% могли быть отнесены к одной из 13 геномогрупп. В дальнейшее исследование были взяты только штаммы с индивидуальным генетическим профилем (n=78).

Анализ результатов теста на чувствительность UPEC к антимикробным агентам показал, что 39,7% культур были чувствительны к исследуемым препаратам, а 60,3%

проявляли устойчивость хотя бы к одному антибиотику. Более трети штаммов (38,5%) оказались нечувствительны к трем и более препаратам, а 16,7% – к пяти и более. БЛРС-продуцирующими были 25,6% культур, 85% из которых имели устойчивость к трем и более антимикробным агентам. Изученные штаммы *E. coli* имели разный уровень устойчивости к мирамистину и хлоргексидину биглюконату: медианы (Me) показателя, характеризующего бактериостатический эффект, для данных растворов составили 0,0025% и 0,0008%, соответственно (*W*-test: $p=0,0004$). Следует отметить, что размах показателя МПК для хлоргексидина был незначительным, тогда как для мирамистина он колебался в пределах от 0,0025% до 0,01%. Оба раствора являются катионными соединениями, поэтому изменение заряда клеточной стенки может влиять на ее проницаемость для биоцидов, что и проявляется в разной чувствительности штаммов. При этом бактерицидный эффект исследуемых антисептиков был детектирован практически при одной концентрации растворов: медианы показателя МБК составили 0,0050% и 0,0047% для мирамистина и хлоргексидина биглюконата, соответственно. Учитывая схожесть биоцидного механизма действия двух растворов на бактерии, связанного с изменением проницаемости клеточных мембран, это вполне объяснимо. Мирамистин взаимодействует с липидным слоем мембраны, вызывая ее деформацию и увеличивая проницаемость, что, в конечном счете, индуцирует цитолиз. Механизм действия хлоргексидина заключается во взаимодействии с фосфатными группами липополисахарида на поверхности клетки, вследствие чего возникает смещение осмотического равновесия, нарушение целостности клетки и её гибель. Наши данные совпадают с результатами исследования Палий Г.К. и соавт. (2013), в которых показана высокая противомикробная активность мирамистина и хлоргексидина биглюконата в отношении нозокомиальных штаммов *E. coli*, изолированных из реанимационных отделений [10].

Считается, что бактериальные штаммы, циркулирующие в госпитальных условиях, обладают большим вирулентным потенциалом и, в том числе, являются более резистентными к лекарственным препаратам [5]. Исследуемые УРЕС были разделены на две условные группы сравнения: «индивидуальные» штаммы с уникальным генетическим профилем ($n=65$) и «циркулирующие», попавшие в одну из геномогрупп ($n=13$). Показано, что «циркулирующие» штаммы чаще были устойчивы к антибиотикам, чем «индивидуальные» культуры. Представители первой группы в 76,9% случаев были резистентны хотя бы к одному препарату, в 69,2% – к трем и более, в 53,9% – к четырем и более и в 30,8% – к пяти и более антибиотикам, в сравнении с «индивидуальными» штаммами, которые имели соответствующие уровни устойчивости в 56,9%, 32,3% (*F*-test: $p=0,0153$), 18,5% (*F*-test: $p=0,0122$) и 13,6% случаев. Кроме того, среди «индивидуальных» изолятов только 20% имели фенотип продукции БЛРС, в то время как «циркулирующие» были БЛРС-положительными в 53,9% случаев (*F*-test: $p=0,0172$). Медианные значения МПК растворов мирамистина и хлоргексидина биглюконата для «индивидуальных» уropатогенных штаммов *E. coli* составили 0,0025% и 0,0004%, соответственно (*W*-test: $p=0,012$). Рост «циркулирующих» штаммов подавлялся при концентрации 0,0038% и 0,0008% (*W*-test: $p=0,012$) данных антисептических препаратов. Бактерицидную активность растворы проявляли в концентрациях 0,005% в отношении «индивидуальных» УРЕС и 0,0063% мирамистин и 0,0044% хлоргексидин биглюконат в отношении «циркулирующих». Штаммы, для которых были отмечены эпидемиологические цепочки, имели более высокие уровни МПК и МБК антисептических растворов по сравнению с «индивидуальными».

Корреляционный анализ чувствительности бактериальных культур к антибиотикам и антисептикам выявил тенденцию к сочетанной устойчивости к данным группам препаратов

среди «циркулирующих» УРЕС. Так, коэффициенты корреляции МПК и МБК с количеством антибиотиков, к которым штаммы проявляют резистентность, были $r_s=0,416$ и $r_s=0,573$ для мирамистина, а для хлоргексидина биглюконата сила связи $r_s=0,772$ была определена только для МБК, так как МПК у всех штаммов была идентичной. Ранее также показана связь между устойчивостью к антибиотикам (бета-лактамы, хинолоны и аминогликозиды) и хлоргексидину среди грамотрицательных бактерий. Авторы считают, что изменения во внешней или внутренней мембранах, а также модификации в эффлюкс-насосах могут быть ответственны за устойчивость бактерий к обеим группам биоцидов [8].

Заключение. Исследования устойчивости к биоцидам становятся крайне важными, наряду с традиционно осуществляемой в разных странах большой работой, связанной с выявлением антибиотикоустойчивости у микроорганизмов. Зачастую скрининг штаммов, резистентных к дезинфицирующим средствам и антибиотикам, осуществляют одновременно. Уропатогенные штаммы *E. coli*, выделенные в стационарах медицинских учреждений г. Перми, имеют высокий уровень устойчивости к антибиотическим, а, в ряде случаев, и к антисептическим препаратам, применяющимся в урологической практике. Треть культур, изолированных из мочевыводящих путей пациентов, оказались внутрибольничными и могли иметь срок циркуляции до двух недель. Показано, что «циркулирующие» штаммы более устойчивы к антибиотикам и антисептикам по сравнению с «индивидуальными» УРЕС. Кроме того, внутрибольничные культуры проявляли тенденцию к сочетанной устойчивости к двум группам препаратов. Проведенное исследование показывает, что система мониторинга клинических изолятов УРЕС требует постоянного совершенствования, а также должна включать оценку эффективности действия не только антибиотических агентов, но и дополнительных препаратов, используемых в комплексной терапии инфекций мочевыводящих путей.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 19-44-590014-р_а.

Библиографический список

1. Яковлев С.В., Суворова М.П. Нозокомиальные инфекции мочевыводящих путей // Урология. – 2016. – №3. – С. 45-64.
2. Iacovelli V., Gaziev G., Topazio L., Bove P., Vespasiani G., Finazzi Agrò E. Nosocomial urinary tract infections: A review // Urologia. – 2014. – V. 81. – №4. – P. 222-227.
3. Kot B. Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli* // Pol. J. Microbiol. – 2019. – V. 68. – №4. – P. 403-415.
4. Рафальский В.В. Антибиотикорезистентность возбудителей неосложненных инфекций мочевых путей в Российской Федерации // Вестник урологии. – 2018. – Т. 6. – №3. – С. 50-56.
5. Гудкова Е.И., Адарченко А.А., Слабко И.Н., Ласточкина Т.М., Симоненко Л.И. Формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам возбудителей внутрибольничных инфекций и её микробиологический мониторинг // Белорусский медицинский журнал. – 2003. – №3(5). – С. 57-60.
6. Сергеевнин В.И., Клюкина Т.В., Волкова Э.О., Решетникова Н.И., Зуева Н.Г., Авдеева Н.С. Приобретенная устойчивость возбудителей внутрибольничных гнойно-септических инфекций к дезинфицирующим и антисептическим средствам // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – №1. – С. 41-46.
7. Родин В.Б., Кобзев Е.Н., Детушева Е.В., Мартынова В.Н., Тимошинова Е.В., Детушев К.В. и др. Перекрестная устойчивость микроорганизмов к антибиотикам, сопряженная с резистентностью к дезинфектантам // Дезинфекционное дело. – 2011. – №4. – С. 20-26.

8. KoÄ Ijalg S., Naaber P., Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility // J. Hospital Infect. – 2002. – V. 51. – P. 106-113.

9. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // Nucleic Acids Res. – 1991. – V. 19. – №24. – P. 6823-6831.

10. Палий Г.К., Назарчук А.А., Палий Д.В., Назарчук С. А., Гончар О.О., Береза Б.Н., Кордон Ю.В., Задерей Н.В., Трофименко Ю.Ю. Анализ чувствительности клинических штаммов эшерихий, выделенных из организма больных детей, к антибиотикам, антисептикам // Педиатр. – 2013. – Т. 4, №4. – С. 23-27.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ

Карпова А.Ю., Зорина Т.А., Горбушина Е.Р.

ФГБОУ ВО Ижевская государственная сельскохозяйственная академия, г. Ижевск, Россия

Ключевые слова: дерново-подзолистые почвы, дыхание почвы, микроорганизмы

С течением времени в науке накапливаются новые факты, подтверждающие, что почвообразование – это биологический процесс, а плодородие почвы неразрывно связано с жизнедеятельностью населяющих её микроорганизмов. Плодородие почвы – её способность удовлетворять потребность растений в питательных веществах, воздухе, воде, тепле, биологической и физико-химической среде и обеспечивать урожаи сельскохозяйственных культурных растений при хорошем качестве продукции. Плодородие почвы определяет ценность земли как основного средства сельскохозяйственного производства в конкретном предприятии [1]. Микроорганизмы являются ключевым фактором почвообразовательного процесса, питания растений и фитосанитарного состояния почв [3], так как пропускают через себя весь органический материал, поступающий в педосферу ($\approx 90\%$ всего потока CO_2 суши) [11, 12]. Эта особенность и чувствительность к малейшим нарушениям среды позволяют использовать микробиологические характеристики для оценки экологического состояния почв.

Почвенный покров Удмуртии характеризуется большой пестротой не только по генезису, но и важными в агрономическом плане физическими, химическими, биологическими свойствами [2]. Численность микроорганизмов в почве может существенно изменяться: в зависимости от температуры и влажности, количества органического вещества и других элементов питания, микроорганизмы могут быстро размножаться и вымирать, то есть их численность весьма динамична [8]. Почвенная микрофлора очень важна в жизни растений, так как она образует биологически активный слой в ризосфере, улучшает питательный режим растений, способна предохранять их от болезней. Существуют естественные симбиотические взаимоотношения растений и микроорганизмов, которые играют большую роль в жизни обоих участников симбиоза. В настоящее время сравнительно немного информации об этих взаимоотношениях и о роли микроорганизмов в питании растений [10, 13].

Влияние типа почвы на количество и состав микрофлоры изучалось многими учеными, но их мнения различны. По данным Е.Н. Мишустина [8], микроорганизмы распространены в строгой географической зональности. Н.А. Красильников [6] считает, что численность и состав почвенной микрофлоры зависят от экологических факторов окружающей среды – растительности, влажности, температуры. При определении

заселенности почвы микроорганизмами необходимо учитывать не только их численность, но и активность микрофлоры, то есть биологическую активность почвы. В агробиоценозах различные агротехнические приемы (удобрение, обработка почвы, чередование культур в севообороте и др.) существенно влияют на почвенную микрофлору, поэтому изменения биологических свойств почвы в зависимости от возделываемой культуры отражаются на ее плодородии [4]. В Удмуртской Республике изучением этих вопросов в целинных почвах занимался В.П. Ковриго, который отмечал слабую биологическую активность дерново-подзолистых почв [5].

Исследования, проведенные в 2015 г. на землепользовании СХПК имени Мичурина Вавожского района Удмуртской Республики, показали, что более высокая урожайность получена на тех участках, где выше численность микроорганизмов. Однако корреляционная связь этих показателей слабая, что, скорее всего, связано с большим разнообразием микрофлоры на изучаемых площадках. Расчет корреляционной зависимости урожайности с показателями ферментативной активности выявил слабую корреляционную связь с ферментами: каталазой, уреазой, инвертазой [4].

Из проведенного анализа работ следует, что степень окультуренности почвы можно оценивать по уровню урожайности сельскохозяйственных культур. Для более подробной ее характеристики следует использовать микробиологические показатели: численность микроорганизмов, активность ферментов и др.

При длительном сельскохозяйственном использовании почв в значительной степени изменяются не только их агрохимические свойства (кислотность, содержание элементов питания и др.), но и биологические показатели. В связи с этим особенно ценно провести изучение этих изменений в условиях длительных полевых опытов с удобрениями. Кафедрой агрохимии и почвоведения Ижевской ГСХА с 1979 г. проводится стационарный полевой опыт, входящий в Географическую сеть опытов РФ, где изучается эффективность различных доз, сочетаний и соотношений элементов питания на дерново-среднеподзолистой среднесуглинистой почве.

В 2020 г. в рамках данного длительного опыта нами были проведены исследования качественного и количественного состава микроорганизмов в почве, а также продуцирование почвой углекислого газа (дыхание почвы) в полевых условиях. Посевы почвенных проб были осуществлены в чашках Петри на мясопептонный агар (МПА) и крахмало-аммиачный агар (КАА); разбавление 1:100000. Дыхание почвы определяли по методу Штатнова в модификации Б.Н. Макарова 24 июня 2020 г. Возделываемая культура – клевер луговой.

Анализы проведены на наиболее контрастных вариантах опыта (схема представлена в табл. 1). Известкование проводили один раз в восемь лет по полной гидролитической кислотности почвы; навоз вносили один раз в четыре года под пропашную культуру. Минеральные удобрения вносили ежегодно; клевер в 2020 г. возделывался по последствию ранее внесённых удобрений.

В контрольном варианте удобрения все годы исследований не вносили, проводили только периодическое известкование. По сравнению с контролем при использовании только минеральных удобрений снизилось количество бактерий, но возросла численность актиномицетов. Обратная зависимость получена при использовании органической системы удобрения (вариант 5). Положительное влияние органоминеральной системы удобрения (вариант 4) выразилось в увеличении численности всех рассматриваемых групп микроорганизмов.

Интенсивность выделения почвой углекислого газа связана с деятельностью почвенной микрофлоры. Как видно на рис. 1, этот показатель также в значительной мере определяется применением удобрений.

Таблица 1

Влияние длительного использования удобрений на количественный и качественный состав микроорганизмов в почве (Удмуртская Республика, 2020 г.)

Варианты	Численность микроорганизмов, млн. КОЕ / 1 г почвы	
	МПА (бактерии)	КАА (актиномицеты)
1. Известь – контроль	1,6	2,1
2. Известь + N ₁ P ₁ K ₁	1,3	4,0
3. N ₁ P ₁ K ₁	1,5	4,8
4. Известь + навоз 40 т/га + N ₁ P ₁ K ₁	2,6	3,3
5. Известь + навоз 40 т/га	1,7	1,4

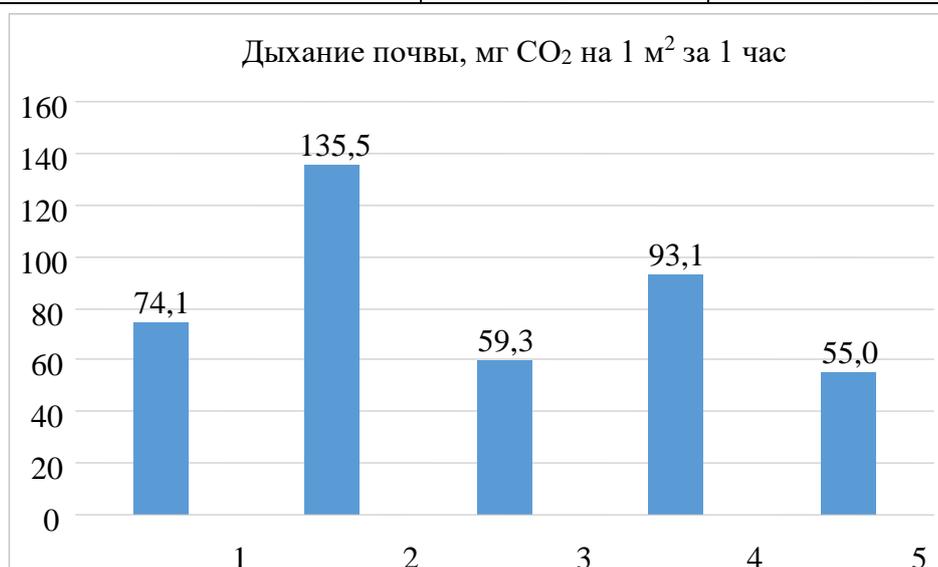


Рисунок 1 - Влияние длительного использования удобрений на выделение СО₂ почвой (Удмуртская Республика, 2020 г.)

Наиболее высокая интенсивность дыхания почвы получена при использовании минеральных удобрений на фоне периодического известкования (вариант 2). Выражено также увеличение этого показателя относительно контрольного варианта при сочетании органических удобрений с минеральными. Однако использование только органической или только минеральной систем удобрения не способствовало повышению уровня продуцирования почвой углекислого газа. Так как многими исследователями [5, 7] выявлено, что газообмен между почвой и атмосферой зависит от физико-химических и биологических свойств почвы, интенсивность дыхания почвы можно считать надежным показателем её плодородия и эффективности агротехнических мероприятий.

Таким образом, длительное использование агрохимикатов в значительной степени изменяет уровень плодородия дерново-среднеподзолистой среднесуглинистой почвы, о чём свидетельствуют показатели её биологических свойств, в частности, количественный и качественный состав почвенной микрофлоры, а также интенсивность выделения почвой углекислого газа.

Библиографический список

1. Бортник, Т. Ю. К вопросу об интегральной оценке уровня эффективного плодородия почв в современных условиях / Бортник Т.Ю., Клековкин К.С. // Инновационные технологии для реализации программы научно-технического развития сельского хозяйства : материалы Международной научно-практической конференции, 13-16 февраля 2018 года, г. Ижевск : в 3 т. - Ижевск, 2018. - Т. 1. - С. 11-17
2. Галева, Т. Н. Связь плодородия почв с урожайностью яровой пшеницы в КФХ Лебедева А. Г. Шарканского района Удмуртии / Т. Н. Галева, И. Ю. Бехтерева; науч. рук. В. И. Макаров // Научные труды студентов Ижевской ГСХА / учредитель ФГБОУ ВО "Ижевская государственная сельскохозяйственная академия". - Ижевск, 2017. - № 1 (4). - С. 31-33.
3. Звягинцев, Д. Г. Почва и микроорганизмы. / Д. Г. Звягинцев – Москва: Изд-во МГУ, 1987. – 256 с.
4. Карпова, А. Ю. Микробиологическая активность дерново-подзолистых почв и ее связь с продуктивностью зерновых культур / А. Ю. Карпова, Т. Ю. Бортник, А. Б. Горбушина. // Воспроизводство плодородия почв и их рациональное использование : материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук, заслуженного деятеля науки Удмуртской Республики, почетного работника высшей школы Российской Федерации профессора Вячеслава Павловича Ковриго, 24-25 мая 2018 г. - Ижевск, 2018. - С. 312-313
5. Ковриго, В. П. Почвы Удмуртской Республики: монография / В. П. Ковриго. – Ижевск: РИО Ижевская ГСХА, 2004. - С. 248-274.
6. Красильников, Н. А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н. А. Красильников. – Москва: Изд-во АН СССР, 1958. - 462 с.
7. Миненко, А. К. Изменение биологической активности дерново-подзолистых почв при их окультуривании // АгроЭкоИнфо. – 2009. – № 2.
8. Мишустин, Е. Н. Ассоциации почвенных микроорганизмов / Е. Н. Мишустин. – Москва: Наука, 1975. - 107 с.
9. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва: Колос, 1993. - 175 с.
10. Evgenia Blagodatskaya, Yakov Kuzyakov. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches // Soil Biology & Biochemistry, 67. 2013. P. 192-211.
11. Jenkinson D.S. The soil biomass // New Zeland Soil News. – 1977. – Vol. 25. – P. 213–218.
12. Lynch J., Wiseman A. Environmental biomonitoring: the biotechnology eco-toxicology interface. – Cambridge Univ. Press, 1998. – 300 p.
13. Mark S. Coyne and Robert Mikkelsen. Soil microorganisms contribute to plant nutrition and root health // Better Crops. Vol. 99. 2015. № 1. P. 18-20.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ: РАЙ ДЛЯ БАКТЕРИЙ ИЛИ ВЫЗОВ ИНФЕКТОЛОГИИ XXI ВЕКА

Каюмов А.Р., Тризна Е.Ю., Байдамшина Д.Р., Сабирова А.Э.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
г. Казань, Россия

Ключевые слова: биопленки, смешанные инфекции, устойчивость к антибиотикам,

Исследования последних нескольких десятилетий позволяют утверждать, что 90% всех известных микроорганизмов в естественных условиях предпочтительно существуют в виде многоклеточных сообществ – биопленок [1]. При этом многие инфекции связаны с образованием смешанных биопленок, в состав которых входит как патогенная, так и резидентная микрофлора. Межвидовые взаимодействия в смешанной биопленке приводят к появлению новых особенностей сообщества [2], например, повышенной устойчивостью к антимикробным препаратам и высокими уровнями вирулентности и обмена генами устойчивости к антибиотикам [3, 4]. В результате синергетических взаимоотношений в смешанных биопленках происходит адаптивный мутагенез бактерий, изменение метаболических путей, снижение продукции факторов антагонизма, а, следовательно, происходит повышение жизнеспособности бактерий в таких сообществах [1]. Не взирая на достигнутые успехи по борьбе с инфекциями, вызванными образованием биопленок, все они нацелены на терапию мономикробных сообществ. При этом наблюдается низкая эффективность эрадикации смешанных биопленок, в особенности состоящих одновременно из грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Поэтому на сегодняшний день разработка новых подходов для терапии полимикробных сообществ остается актуальнейшей задачей медицинской микробиологии.

В полимикробных сообществах помимо синергетических взаимоотношений, которые способствуют повышению устойчивости бактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, также встречаются антагонистические. Это достигается благодаря образованию различных метаболитов, которые могут как понижать чувствительность одних членов консорциума к антибиотикам (например, метаболиты синегнойной палочки [5, 6], так и наоборот, в отдельных случаях наблюдается повышение чувствительности всего сообщества к антибиотикам широкого спектра действия, как было показано в нашей последней работе [7]. Основными агентами в отношении стафилококков являются сидерофоры и молекулы HQNO, которые являются ингибиторами электрон-транспортных цепей в клетках *S. aureus*. Присутствие этих молекул в окружающей среде приводит к переходу золотистого стафилококка к ферментативному типу роста, снижает жизнеспособность бактерий, усиливает формирование биопленок, а также способствует образованию так называемых малых форм колоний [8]. Примечательно, что переход к фенотипу малых форм улучшает выживаемость *S. aureus* в неблагоприятных условиях, поскольку он демонстрирует повышенную устойчивость к бета-лактамам, гликопептидам, аминогликозидам, макролидам, а также внутриклеточную выживаемость [5]. В то же время бесклеточная культуральная жидкость *P. aeruginosa* повышает чувствительность клеток в составе биопленок *S. aureus* к различным антимикробным соединениям, включая фторхинолоны, антибактериальные агенты, нацеленные на мембрану, и антисептик хлороксиленол, в то же время способствует толерантности к бета-лактамам, гликопептидам, аминогликозидам, макролидам [9].

Кроме того, в условиях подавления биопленки стафилококка соединением F105 [10, 11], ванкомицин, цефтриаксон и тетрациклин, неактивные против *P. aeruginosa*, приводили к полной гибели клеток *S. aureus* в монокультуре, в составе полимикробной биопленки, *S. aureus* перераспределялись из верхних слоев биопленки в нижние тем самым приобретая диффузный барьер от антибиотиков благодаря способности встраиваться в матрикс *P. aeruginosa*, и становились нечувствительны к данным антибиотикам. В присутствии ципрофлоксацина, гентамицина и амикацина, которые активны против обоих штаммов, снижение числа жизнеспособных клеток и *S. aureus* и *P. aeruginosa* в полимикробном сообществе более чем на 3 порядка наблюдалось при концентрациях антибиотиков в 4 раза ниже, чем в монокультурах обоих штаммов. В случае внедрения одного штамма к сформированной биопленке другого штамма также было установлено повышение эффективности антибиотиков широкого спектра действия против бактерий в составе биопленки. Наиболее ярко данный эффект был выражен для аминогликозидов. Кроме того, при добавлении культуральной жидкости золотистого стафилококка наблюдалось также повышение эффективности всех антибиотиков широкого спектра действия, а при инкубации в концентрированной культуральной жидкости наблюдалась полная гибель синегнойной палочки в составе биопленки [7]. Вероятно, подобные результаты являются следствием биосинтеза внеклеточных метаболитов клетками *S. aureus*, которые негативно влияют на жизнеспособность *P. aeruginosa* в составе биопленки, однако природа данных соединений и механизм их действия остается неизученным. В настоящее время известно лишь небольшое количество молекул, продуцируемых клетками золотистого стафилококка, такие как антимикробные пептиды, лантибиотики, а также протеолитические ферменты, которые обладают антимикробным действием. Поиск и идентификация факторов антагонизма *S. aureus* позволит использовать их в качестве антагонистов для борьбы с патогенной микрофлорой и повышения эффективности антибиотикотерапии при бактериальных инфекциях различного рода, а получение и продукция молекул позволит создавать новые антимикробные препараты.

Одними из широко используемых в настоящее время антимикробных дезинфицирующих и антисептических препаратов являются катионные поверхностно-активные соединения в виде четвертичных аммониевых солей, например, мирамистин, флуомизин, бензалкония хлорид, однако к данным соединениям бактерии также могут вырабатывать устойчивость. В НОЦ Фармацевтики КФУ на основе пиридоксина (витамина В6) были синтезированы соединения, одно из которых, под условным названием KFU-127 продемонстрировал высокую эффективность против бактериальных и грибковых клеток [12]. Так, антимикробная и антимикотическая активности KFU-127 *in vitro* были сопоставимы или даже выше чем у контрольных противогрибковых (тербинафин, флуконазол) и антимикробных препаратов (мирамистин, бензалконий хлорид). При этом KFU-127 убивало клетки в составе биопленки в концентрациях в 2-4 раза ниже, чем у препаратов сравнения, а также было способно к эрадикации смешанной биопленок *S. aureus*-*P. aeruginosa*, *S. aureus*-*E. coli*, *S. aureus*-*C. albicans* [12].

Эксперименты по идентификации молекулярных мишеней соединения показали, что в клетках, выращенных при сублетальных концентрациях KFU-127, повышается содержание ферментов путей гликолиза и катаболизма аминокислот, где пиридоксаль является кофактором многих ферментов. Так как модификация пиридоксина может вызвать его необратимое связывание с ферментами и привести к их ингибированию, была высказана гипотеза что одним из механизмов действия соединения может служить подавление активности пиридоксаль-зависимых ферментов. Действительно, активность пиридоксаль-зависимого фермента глутамат декарбоксилазы подавлялась *in vitro* в присутствии KFU-

127, что подтверждает высказанную гипотезу. Этим также можно объяснить факт, что соединение KFU-127, в отличие от мирамистина, ванкомицина, антибиотиков ряда фторхинолонов и антифунгицидных препаратов не способствовало образованию устойчивости, так как антисептик мимикрирован под ключевой клеточный метаболит. С другой стороны, в присутствии KFU-127 наблюдалось резкое падение мембранного потенциала клеток бактерий, что говорит о втором механизме действия соединения путем нарушения плазматической мембраны.

Наконец, повысить эффективность эрадикации сформированных микробных биопленок можно путем ферментативного гидролиза матрикса биопленки. Ранее мы показали, что фицин разрушает стафилококковые биопленки и повышает эффективность различных противомикробных препаратов против клеток, внедренных в биопленку [13]. Так, растворимый фицин в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл приводил к значительному уменьшению биомассы биопленок, образованных как *S. aureus*, так и *S. epidermidis* (остаточные биопленки составляли 50% и 20% от первоначальной). Также исследовали эффект фицина иммобилизованный на среднемолекулярном хитозане сотрудниками Воронежского государственного университета. Интересно, что обработка как хитозаном, так и иммобилизованным ферментом приводила к умеренному разрушению биопленки. Тем не менее, анализ показал, что обработка растворимым или иммобилизованным фицином приводила к аналогичному уменьшению жизнеспособных клеток в биопленке, подтверждая, что иммобилизованный фицин сохраняет активность против биопленок стафилококка и также повышает эффективность антимикробных препаратов в отношении бактерий в составе биопленки. Так, цiproфлоксацин и бензалкония хлорид при концентрациях, соответствующих 2-4×МБК приводили к достоверно большему снижению остаточной метаболической активности адгезированных клеток, обработанных иммобилизованным фицином [14]. Таким образом, фицин в растворимой и иммобилизованной формах представляет интерес для разработки ранозаживляющей терапии с применением этого фермента.

Работа выполнена при поддержке грантов Российского Научного Фонда (№15-14-00046 и 20-64-47014) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№18-33-20051, 20-04-00247).

Библиографический список

1. Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. –V. 14. –P. 563-575.
2. Dalton, T., Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., Watters, C., Griswold, J. A., Rumbaugh, K. P. An In Vivo Polymicrobial Biofilm Wound Infection Model to Study Interspecies Interactions. *Plos One.* – 2011. –V. 6.
3. Montelongo-Jauregui, D., Srinivasan, A., Ramasubramanian, A. K., Lopez-Ribot, J. L. An *In Vitro* Model for Oral Mixed Biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus gordonii* in Synthetic Saliva. *Front. Microbiol.* – 2016. –V. 7.
4. Seth, A. K., Geringer, M. R., Galiano, R. D., Leung, K. P., Mustoe, T. A., Hong, S. J. Quantitative Comparison and Analysis of Species-Specific Wound Biofilm Virulence Using an In Vivo, Rabbit-Ear Model. *J. Am. College of Surgeons.* – 2012. –V. 215, 388-399.
5. Orazi, G., O'Toole, G. A. *Pseudomonas aeruginosa* Alters *Staphylococcus aureus* Sensitivity to Vancomycin in a Biofilm Model of Cystic Fibrosis Infection. *Mbio.* –2017. –V. 8.
6. Orazi, G., Ruoff, K. L., O'Toole, G. A. *Pseudomonas aeruginosa* Increases the Sensitivity of Biofilm-Grown *Staphylococcus aureus* to Membrane-Targeting Antiseptics and Antibiotics. *Mbio.* –2019. –V. 10.

7. Trizna, E. Y., Yarullina, M. N., Baidamshina, D. R., Mironova, A. V., Akhatova, F. S., Rozhina, E. V., Fakhrullin, R. F., Khabibrakhmanova, A. M., Kurbangalieva, A. R., Bogachev, M. I., Kayumov, A. R. Bidirectional alterations in antibiotics susceptibility in *Staphylococcus aureus*-*Pseudomonas aeruginosa* dual-species biofilm. *Sci. Rep.* – 2020. –V. 10, –P. 14849.

8. Tognon, M., Köhler, T., Luscher, A., van Delden, C. Transcriptional profiling of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* during *in vitro* co-culture. *BMC Genomics.* – 2019. –V. 20. –P. 30.

9. Orazi, G., Ruoff, K. L., O'Toole, G. A. *Pseudomonas aeruginosa* Increases the Sensitivity of Biofilm-Grown *Staphylococcus aureus* to Membrane-Targeting Antiseptics and Antibiotics. *mBio.* –2019. –V. 10.

10. Sharafutdinov, I. S., Trizna, E. Y., Baidamshina, D. R., Ryzhikova, M. N., Sibgatullina, R. R., Khabibrakhmanova, A. M., Latypova, L. Z., Kurbangalieva, A. R., Rozhina, E. V., Klinger-Strobel, M., Fakhrullin, R. F., Pletz, M. W., Bogachev, M. I., Kayumov, A. R., Makarewicz, O. Antimicrobial Effects of Sulfonyl Derivative of 2(5H)-Furanone against Planktonic and Biofilm Associated Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology.* –2017. –V. 8. –P. 2246.

11. Sharafutdinov, I. S., Ozhegov, G. D., Sabirova, A. E., Novikova, V. V., Lisovskaya, S. A., Khabibrakhmanova, A. M., Kurbangalieva, A. R., Bogachev, M. I., Kayumov, A. R. Increasing Susceptibility Of Drug-Resistant *Candida Albicans* To Fluconazole And Terbinafine By 2(5h)-Furanone Derivative. *Molecules.* –2020. –V. 25. –P.642

12. Garipov, M. R., Sabirova, A. E., Paveleyev, R. S., Shtyrlin, N. V., Lisovskaya, S. A., Bondar, O. V., Laikov, A. V., Romanova, J. G., Bogachev, M. I., Kayumov, A. R. & Shtyrlin, Y. G. Targeting pathogenic fungi, bacteria and fungal-bacterial biofilms by newly synthesized quaternary ammonium derivative of pyridoxine and terbinafine with dual action profile. *Bioorg Chem.* –2020. –V. 104, –P. 104306.

13. Baidamshina, D. R., Trizna, E. Y., Holyavka, M. G., Bogachev, M. I., Artyukhov, V. G., Akhatova, F. S., Rozhina, E. V., Fakhrullin, R. F. Kayumov, A. R. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease, *Scientific Reports.* –2017. –V. 7. –P.46068.

14. Baidamshina, D. R., Koroleva, V. A., Trizna, E. Y., Pankova, S. M., Agafonova, M. N., Chirkova, M. N., Vasileva, O. S., Akhmetov, N., Shubina, V. V., Porfiryev, A. G., Semenova, E. V., Sachenkov, O. A., Bogachev, M. I., Artyukhov, V. G., Baltina, T. V., Holyavka, M. G., Kayumov, A. R. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin. *Int J Biol Macromol.* – 2020. –V. 164. –P.4205-4217.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КРАСНОСЕРОЙ ПОЛЕВКИ *CRASEOMYS RUFOCANUS* (SUNDEVALL, 1846) НА РАВНИННЫХ И ГОРНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Кислый А. А.

ФГБОУ ВО Омский государственный педагогический университет, г. Омск, Россия

ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Ключевые слова: распределение, красносерая полевка, Западная Сибирь, биотопические предпочтения.

Распределение красносерой полевки рассмотрено на равнинных и горных территориях Западной Сибири в границах, описанных М.И. Помусом и Г.Д. Рихтером [1]. В нее входят Западно-Сибирская равнина и часть гор Южной Сибири: Кузнецкий Алатау,

Салаирский кряж и Горная Шория, объединенная в Кузнецко-Салаирскую горную область, а также Алтайская горная область.

Красносерая полевка обитает в лесах, часто в долинах рек, где, как правило, предпочитает густые заросли. Питается вегетативными частями трав, кустарничками и ягодами [2-5]. Обычна в горно-таежных ельниках и кедрачах, по речным долинам проникает в равнинную и горную тундры [6]. По литературным данным, на Западно-Сибирской равнине эта полевка встречается от лесотундровых редколесий до лесостепи, при этом больше всего ее в средней и южной тайге. От северной границы распространения до средней тайги она предпочитает внепойменные незаболоченные местообитания, южнее – поймы крупных рек. На болотах ее обилие незначительно, кроме как в южной тайге и лесостепной зоне [7]. В горах юга Сибири эта полевка наиболее многочисленна в темнохвойных лесах, в поросших кедром крупнокаменистых осыпях и подгольцовых редколесьях [8].

В работе проанализированы результаты учетов мелких млекопитающих во второй половине лета в период с 1954 по 2016 гг. в 3479 биотопах Западной Сибири, считая места повторного сбора данных в аналогичных местообитаниях в разные годы. Сведения об обилии красносерой полевки взяты из банка данных лаборатории зоологического мониторинга ИСиЭЖ СО РАН [9]. В исследовании участвовали 84 специалиста. Их список опубликован ранее [10]. Учеты проведены с помощью давилок, ловчих канавок и заборчиков. Все показатели обилия даны в пересчете на 100 цилиндро-суток (ц.с.). Для этого число особей на 100 давилко-суток сначала приведено к их количеству на 1 км² (умножением на 400), а потом уменьшено в 145 раз (множитель перевода со 100 ц.с. на 1 км²) [11]. Полевку считали многочисленной в тех местообитаниях, где ее обилие составляет 10 и более особей на 100 ц.с., обычной – от 1 до 9; редкой – от 0.1 до 0.9; очень редкой – менее 0.1, чрезвычайно редкой – менее 0.01 [11].

Для описания распределения красносерой полевки использованные материалы, усреднены за все годы проведения учетов по группам выделов карты растительности Западной-Сибирской равнины [12] отдельно по зонам и подзонам, в для горной части – по выделам рукописной карты В.П. Седельникова «Экосистемы республики Алтай» отдельно по провинциям с уточнением по «Ландшафтной карте Алтае-Саянского экорегиона» (2001). Это в значительной степени выравнивает межгодовые и частные колебания обилия исследуемого вида. В указанные в тексте группы выделов входят коренные формации и их производные, за исключением мелколиственных лесов, а также полностью или частично распаханых участков, которые рассмотрены в качестве отдельных местообитаний. Поэтому, если в тексте названа лишь коренная формация, сказанное о ней относится и к ее производным. Усредненные показатели рассчитаны как простые средние, без учета соотношения площадей местообитаний.

В целом по Западной Сибири красносерая полевка обычна (1 особь/ 100 ц.с.; далее в тексте этот показатель приведен без наименования), а на равнине – редка (0.9). Здесь она населяет лесную, лесостепную и степную зоны.

В предтундровых редколесьях эта полевка в среднем чрезвычайно редка (0.007) и встречена лишь в лиственничных редколесьях (0.03). В северной тайге красносерой полевки уже значительно больше (0.2). Здесь она обычна в лиственничных редкостойных лесах (1), редка в темнохвойной тайге (0.2), очень редка – в сосняках (0.01) и в лесокустарниково-сорово-луговых сообществах пойм крупных рек и долин их притоков (0.02). В лиственничных редколесьях, селитебных местообитаниях (поселки и участки малоэтажной застройки окраин городов) и на болотах эта полевка не встречена.

В целом по средней тайге красносерая полевка редка (0.4). Чаще ее ловили в темнохвойной тайге и лугово-кустарниково-лесных сообществах долин притоков крупных рек (по 1). Вдвое меньше ее в мелколиственных и сосновых лесах, а также в селитебных местообитаниях, втрое меньше – на верховых болотах. Обитание этой полевки в лесо-кустарниково-соровых сообществах пойм крупных рек и на переходных болотах подзоны не выявлено.

В среднем по южной тайге красносерая полевка обычна (3) и предпочитает леса, независимо от состава лесобразующих пород (по 4). Вдвое меньше ее в полях-перелесках и вчетверо – на открытых полях. В лесо-кустарниково-луговых сообществах пойм крупных рек и долин их притоков, селитебных местообитаниях и на болотах она редка (0.1–0.6).

В целом по подтаежным лесам эта полевка редка (0.6). Здесь ее больше всего в селитебных местообитаниях (3). Обилие красносерой полевки снижается к темнохвойной тайге (2), мелколиственным лесам (1) и соснякам (0.5). Изредка ее ловили в лесо-кустарниково-луговых сообществах пойм крупных рек, полях-перелесках и на верховых болотах (0.1–0.3). Кроме того, она очень редка на низинных болотах (0.09) и не встречена в лугово-кустарниково-лесных местообитаниях долин притоков крупных рек и на переходных болотах.

В целом по лесной зоне красносерая полевка обычна (1) и предпочитает лесные местообитания: лиственничные в предтундровых редколесьях и северной тайге, а южнее – темнохвойные.

В среднем по лесостепной зоне эта полевка редка (0.7) и предпочитает участки мелколиственных и сосновых лесов, где она обычна (3 и 2). Редка она в селитебных местообитаниях, болотно-лугово-лесных сообществах пойм крупных рек и долин их притоков, а также на болотах (0.1–0.4). Очень редка красносерая полевка в полях, открытых и с перелесками (0.06 и 0.09). В степях и на сплавинах озер она не встречена.

В целом по степной зоне красносерая полевка обычна (1). Здесь ее больше всего в болотно-лугово-лесных сообществах пойм крупных рек и долин их притоков (4), а также в полях-перелесках (3). Изредка эту полевку ловили в селитебных местообитаниях и степях (по 0.6), еще реже – на открытых полях (0.05). На травяных болотах и сплавинах озер ее не встречали.

Итак, в целом по Западно-Сибирской равнине красносерая полевка предпочитает леса. При их отсутствии она населяет редколесья (в предтундровой подзоне) или другие частично облесенные местообитания, например, поля-перелески в степной зоне. В среднем по зонам и подзонам больше всего этой полевки в южной тайге, к северу от которой обилие неуклонно снижается (рисунок). Увеличение среднего обилия от подтаежных лесов к степи незначительно и статистически недостоверно (при $p=0.1$) – значение показателя на рисунке дано в целом по этой части равнины. При таком допущении можно говорить о ромбовидном изменении встречаемости красносерой полевки в равнинной части Западной Сибири. Такой характер широтной неоднородности обилия характерен также для красной полевки [10].

С добавлением новых сведений об обилии красносерой полевки на Западно-Сибирской равнине скорректированы некоторые полученные ранее представления о ее распределении [7]. Так, в целом по средней тайге она редка (в прошлой работе по распределению мелких млекопитающих – обычна). По использованным в диссертации материалам эта полевка проникает в степную зону. Увеличение ее обилия в сообществах пойм крупных рек южнее средней тайги справедливо только для степной зоны. На болотах равнины красносерая полевка редка, очень редка или не встречена.

В целом по горной территории Западной Сибири красносерая полевка обычна (3). На Алтае она распространена во всех провинциях этой горной области (в среднем 2). В Северо-

Предалтайской провинции эта полевка в среднем редка (0.6) и предпочитает мелколиственные леса (2). Намного реже ее встречали в полях-перелесках (0.5) и луговых степях (0.3). На открытых полях провинции она не встречена.



Рисунок. Обилие красносерой полевки в равнинной и горной частях Западной Сибири

На Северо-Западном Алтае красносерая полевка в целом обычна (8) и многочисленна в сосняках, мелколиственных лесах и селитебных местообитаниях (13–19). Обычна она здесь в подгольцовых редколесьях, мохово-лишайниковых и каменистых тундрах (по 2), редка – в луговых и ерниковых тундрах (0.9) и темнохвойной тайге (0.2).

В среднем по Северному Алтаю эта полевка тоже обычна, хотя ее и меньше (2). Больше других местообитаний она предпочитает подгольцовые редколесья (8), несколько меньше ее в темнохвойных и сосновых лесах (по 5). Кроме того, эта полевка обычна в кустарниково-лесных сообществах пойм (3), мелколиственных и лиственничных лесах (по 2), а также в луговых степях (1). Изредка ее ловили в селитебных местообитаниях, полях-перелесках и во внепойменных лугах (0.7 и по 0.4), очень редко – на открытых полях (0.06).

В целом по Северо-Восточному Алтаю красносерая полевка обычна (3) и предпочитает лиственничные леса и подгольцовые редколесья (9 и 7). Также она обычна в черневой и темнохвойной тайге (по 4), мелколиственных лесах (3), луговых и ерниковых тундрах, на болотах (по 2) и в сосняках (1). В полях-перелесках она редка (0.1), а в открытых полях, долинных лугах и селитебных местообитаниях – не встречена.

На Центральном Алтае эта полевка почти так же обычна в целом (2). Здесь ее больше всего в мелколиственных лесах, подгольцовых редколесьях, а также в мохово-лишайниковых и каменистых тундрах (по 5). Несколько реже эту полевку ловили в лиственничных и темнохвойных лесах (по 4), в черневой тайге и степях (1–2). Редка она в кустарниково-лесных сообществах пойм, открытых полях, субальпийских и альпийских

лугах, луговых и ерниковых тундрах (0.3–0.7). В селитебных местообитаниях и на болотах встретить ее не удалось.

В целом по Восточному Алтаю красносерая полевка редка (0.5) и предпочитает лиственничные леса (2). В селитебных местообитаниях, лугово-лесных сообществах пойм, полях-перелесках, настоящих степях, луговых и ерниковых тундрах она редка (0.2–0.5), а в луговых и опустыненных степях, на болотах и в открытых полях – не встречена.

На Юго-Восточном Алтае эта полевка также в среднем редка (0.7). Здесь ее больше всего в подгольцовых редколесьях и лиственничных лесах (3 и 2), и значительно меньше в луговых и ерниковых тундрах (0.9), настоящих степях (0.8), лугово-кустарниково-лесных сообществах пойм (0.5), а также в тундростепях и долинных лугах (по 0.1). В селитебных местообитаниях, опустыненных степях, мохово-лишайниковых и каменистых тундрах она не встречена.

Красносерая полевка обычна как в целом по Кузнецко-Салаирской горной области (3), так и по отдельным провинциям. На Салаире (2) она предпочитает леса: мелколиственные, сосновые и черневые (по 3 и 2). В селитебных местообитаниях она почти редка (1), а в полях-перелесках – не встречена.

В Кузнецкой котловине (1) этой полевки также больше всего в мелколиственных и черневых лесах (по 2). Изредка ее ловили в пойменных лугах, полях-перелесках и луговых степях (0.6 и по 0.3). Очень редка она в настоящих степях (0.04).

В Кузнецком Алатау красносерая полевка тоже обычна, хотя ее и больше, чем в двух других провинциях горной области (6). Здесь она многочисленна во внепойменных лесных лугах и мелколиственных лесах (12 и 11). Меньше обилие этой полевки в черневой и темнохвойной тайге (8 и 5), лиственничных лесах, подгольцовых редколесьях, полях-перелесках, внепойменных открытых и пойменных лугах (по 3), а также в сосняках, субальпийских и альпийских лугах, мохово-лишайниковых и каменистых тундрах, луговых и ерниковых тундрах (по 2 и 1). Редка она только на болотах (0.6).

В среднем по Алтайской и Кузнецко-Салаирской горным областям красносерая полевка предпочитает леса и подгольцовые редколесья. Высотная неоднородность ее обилия в среднем по поясам носит пирамидальный характер: она одинаково обычна от предгорий до среднегорий, а в высокогорьях ее втрое меньше (рисунок). В то же время встречаемость исследованной ранее красной полевки изменяется ромбовидно: значения показателей двух видов в предгорьях и высокогорьях близки, но у последней наблюдается всплеск численности в низко- и среднегорных местообитаниях, особенно лесах с участием темнохвойных пород деревьев [10].

Итак, в целом по Западной Сибири красносерая полевка чаще населяет леса и редколесья. Порядок предпочитаемых лесообразующих пород различен от места к месту и, вероятно, случаен, либо имеет лишь локальное значение. Несмотря на отсутствие этой полевки в тундровой зоне, ее немало в горных тундрах, особенно мохово-лишайниковых и каменистых.

Исследования, послужившие основой для настоящего сообщения, выполнены по программе ФНИ государственных академий на 2013–2020 гг. АААА–А16–116121410122–4.

Библиографический список

1. Западная Сибирь: природные условия и естественные ресурсы СССР / отв. ред. Г.Д. Рихтер. – М.: АН СССР, 1963. – 487 с.
2. Соколов В.Е. Систематика млекопитающих. Отряды: зайцеобразных, грызунов. В.Е. Соколов. – М.: Высшая школа, 1977. – 494 с.
3. Henttonen H., Viitala J. *Clethrionomys rufocanus* (Sundevall, 1846) – *Graurotelmaus* // *Handbuch der Säugetiere Europas* – 1982. – V. 2. – PP. 147-164.

4. Sulkava S. *Clethrionomys rufocanus* // In: The Atlas of European Mammals (A.J. Mitchell-Jones, G. Amori, W. Bogdanowicz, B. Kryštufek, P.J.H. Reijnders, F. Spitzenberger, M. Stubbe, J.B.M. Thissen, V. Vohralik and J. Zima). – London : Academic Press, 1999. – 484 p.
5. Christensen P., Hörnfeldt B. Habitat Preferences of *Clethrionomys Rufocanus* in Boreal Sweden // *Landscape Ecology*. – 2006. – V. 21. – PP. 185–194. doi:10.1007/s10980-005-1052-6
6. Павлинов И.Я. Звери России: справочник-определитель. Часть 1. Насекомоядные, рукокрылые, зайцеобразные, грызуны. – М. : Товарищество научных изданий КМК, 2019. – 340 с.
7. Равкин Ю.С., Богомолова И.Н., Ермаков Л.Н., Панов В.В., Буйдалина Ф.Р., Добротворский А.К., Вартапетов Л.Г., Юдкин В.А., Торопов К.В., Лукьянова И.В., Покровская И.В., Жуков В.С., Цыбулин С.М., Фомин Б.Н., Стариков В.П., Шор Е.Л., Чернышова О.Н., Соловьёв С.А., Чубыкина Н.Л., Ануфриев В.М., Бобков Ю.В., Ивлева Н.Г., Тертицкий Г.М. Особенности распределения мелких млекопитающих Западно-Сибирской равнины // *Сибирский экологический журнал*. – 1996. – Т. 3. – № 3-4. – С. 307-317.
8. Виноградов В.В. Пространственно-временная организация сообществ мелких млекопитающих Приенисейской части Алтае-Саянской горной страны. – Красноярск : КГПУ им. В.П. Астафьева, 2012. – 284 с.
9. Банк данных: информация, правила для вкладчиков. Сайт лаборатории зоологического мониторинга ИСиЭЖ СО РАН [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://eco.nsc.ru/zoomonit/zoomonitor.htm> (дата обращения: 05.01.2012).
10. Кислый А.А., Равкин Ю.С., Богомолова И.Н., Цыбулин С.М., Стариков В.П., Панов В.В., Юдкин В.А., Вартапетов Л.Г., Соловьёв С.А. Распределение красной полевки *Myodes rutilus* (Pallas, 1779) в Западной Сибири // *Сибирский экологический журнал*. – 2019. – Т. 26. – № 1. – С. 14-28.
11. Кузякин А.П. Зоогеография СССР // *Ученые записки Московского областного пединститута*. – 1962. – Т. 109. – № 1. – С. 3-182.
12. Ильина И.С., Лапшина Е.И., Лавренко Н.Н., Мельцер Л.И., Романова Е.А., Богоявленский Б.А., Махно В.Д. Растительность Западно-Сибирской равнины. Карта масштаба 1: 1 500 000. – М. : ГУГК СССР, 1976.

ФАУНА МЛЕКОПИТАЮЩИХ ИЗ МЕСТОНАХОЖДЕНИЯ РОЖДЕСТВЕНСКОЕ ГОРОДИЩЕ (ПРИКАМЬЕ)

Коновалова К.Ю.

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия*

Ключевые слова: териофауна, археозоология, поздний голоцен, костные остатки

Как правило, костные остатки млекопитающих являются одним из наиболее массовых материалов при проведении археологических раскопок. Изучение остеологического материала из археологических памятников разных эпох может расширить наши представления об истории фауны [6]. Кости животных из раскопок служат прекрасным материалом для изучения динамики фауны голоцена.

Материалом для данной статьи послужили остеологические остатки животных из раскопок Рождественского городища 2012 года, коллекция костей находится на хранении в музее Института экологии растений и животных УрО РАН (№622). Для определения и

описания археозоологического материала была использована эталонная коллекция музея ИЭРиЖ УрО РАН. Возраст особей крупного рогатого скота был определен по методике И.А. Сильвер на основе исследования отдельных зубов и зубных рядов верхних и нижних челюстей [7].

Рождественское городище представляет собой центральную часть Рождественского археологического комплекса, расположенного на левом берегу р. Обва, в 1,3-1,9 км к юго-западу от центральной части с. Рождественск Карагайского района Пермского края. Площадка Рождественского городища прямоугольной формы, площадь – 36 тыс. кв.м. Первое развернутое описание комплекса дал Н.П. Рычков в 1770 году. Позднее объекты комплекса изучались Н.Н. Новокрещённых (1898), В.А. Обориным и В.П. Денисовым (1949), Ю.А. Поляковым (1983), А.М. Белавиным (1985, 1990-1993) и Н.Б. Крыласовой (1997, 2008-2012, 2014-2019). Городище представляет собой остатки крупного хозяйственного и ремесленного центра. По археологическим материалам Рождественское городище датируется X-XIV вв. н.э. [2], что соответствует позднему голоцену. Ранее уже проводились исследования археозоологического материала из данного памятника рядом исследователей [1,3].

В ходе работы было изучено 9866 костей, из которых млекопитающим принадлежит 98,6 % (9722 экз.). Также были обнаружены остатки птиц (127 экз.), рыб (12 экз.) и моллюска (5 экз.), которые не определялись. Среди остатков млекопитающих к неопределимым относится 47,3% (4597 экз.), причём большая часть принадлежат крупным копытным.

Таблица 1

Видовой состав и количество костных остатков из местонахождения Рождественское городище (2012 г.)

Таксон	Количество костей, экз.	Доля, %
Крупный рогатый скот (<i>Bos taurus</i>)	2192	22,22
Лошадь (<i>Equus caballus</i>)	1896	19,22
Мелкий рогатый скот (<i>Capra hircus et Ovis aries</i>)	385	3,90
Речной бобр (<i>Castor fiber</i>)	217	2,20
Лось (<i>Alces alces</i>)	147	1,49
Собака (<i>Canis familiaris</i>)	116	1,18
Заяц (<i>Lepus sp.</i>)	61	0,62
Свинья (<i>Sus scrofa domestica</i>)	52	0,53
Северный олень (<i>Rangifer tarandus</i>)	24	0,24
Куница или соболь (<i>Martes sp.</i>)	12	0,12
Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	11	0,11
Бурый медведь (<i>Ursus arctos</i>)	5	0,05
Белка (<i>Sciurus vulgaris</i>)	5	0,05
Росомаха (<i>Gulo gulo</i>)	1	0,01
Человек (<i>Homo sapiens</i>)	1	0,01
Птица	127	1,29
Рыба	12	0,12
Моллюск	5	0,05
Неопределимые до вида млекопитающие	4597	46,59
Итого	9866	100,00

Человек (*Homo sapiens*). Обнаружен фрагмент таза.

Дикие млекопитающие

Белка (*Sciurus vulgaris*). Найдены целые таз, большая берцовая кость и нижняя челюсть, а также фрагменты бедренной и плечевой кости.

Росомаха (*Gulo gulo*). Найдена целая метаподия.

Бурый медведь (*Ursus arctos*). Найдены три фаланги, метаподия и фрагмент клыка.

Куница или соболь (*Martes* sp.). Костные остатки рода диагностируются по признакам черепа и нижней челюсти [4], были найдены целые и фрагменты бедренных, больших и малой берцовых костей, по которым невозможно провести видовую диагностику. Также был обнаружен фрагмент нижней челюсти, его идентификация до вида не проводилась.

Заяц (*Lepus* sp.). Среди костей зайца большую часть составляют трубчатые кости конечностей: целые метаподии и фаланги и фрагменты плечевых, лучевых, локтевых, берцовых и бедренных костей. Также было найдено десять тазовых костей, две лопатки, две пяточные кости и одно ребро.

Лисица (*Vulpes vulpes*). Найдены целые метаподия, локтевая кость, а также фрагменты бедренных, лучевых, берцовой костей, нижних челюстей и фрагмент одного клыка.

Речной бобр (*Castor fiber*). Среди остатков обнаружены все элементы скелета. Встречаются как целые кости, так и фрагментированные. Остатки принадлежат и молодым, и взрослым животным. Несколько костей имеют следы погрызов собак и следы пребывания в огне.

Северный олень (*Rangifer tarandus*). Найдены целые фаланги и центральная кость заплюсны, фрагменты ребер, бедренных, берцовых, плечевой, лучевой костей, а также фрагменты метаподий, фаланг, костей базиподий и позвонка. В настоящее время вид не встречается на данной территории, ареал ограничивается 60-й параллелью [5].

Лось (*Alces alces*). Найдены как целые (фаланги, кости запястья и заплюсны, отдельные зубы и атлант), так и фрагменты костей всех отделов скелета.

Домашние животные

Крупный рогатый скот (*Bos taurus*). Остатки крупного рогатого скота составляют 43% от определимых костей млекопитающих. Обнаружены кости и взрослых животных, а также новорожденных особей и эмбрионов. Следы погрызов собак имеют 4,3% костей, 4,7% костей со следами пребывания в огне. Анализ состояния зубной системы показал, что большая часть (59%) из черепов и нижних челюстей принадлежит особям старше 30 месяцев, особям в возрасте 18-30 месяцев принадлежит 22% остатков, а особям в возрасте 6-18 месяцев и менее 6 месяцев принадлежат 16% и 3% соответственно.

Лошадь (*Equus caballus*). Кости лошади составляют 37% от определимых остатков млекопитающих. Обнаруженные остатки принадлежат особям разных возрастных групп, а также встречаются кости эмбрионов и новорожденных особей. Следы пребывания в огне несут 4% костей, следы воздействия огня обнаружены на 4% костей. Встречаются сросшиеся позвонки и позвонки с окостеневшими связками, на одном из ребер был замечен сросшийся перелом.

Мелкий рогатый скот (*Capra hircus* et *Ovis aries*). Остатки крупного рогатого скота составляют 7,5% от определимых костей. Встречаются как молодые, так и взрослые особи. 8 костей имеют следы погрызов собак, 37 костей имеют следы пребывания в огне.

Свинья (*Sus scrofa domestica*). Найдены фрагменты черепа, костей конечностей (больших и малой берцовых, бедренных, локтевых, лучевых и плечевых костей), лопаток, позвонков, костей таза и ребер, а также обнаружены фрагменты отдельных зубов.

Собака (*Canis familiaris*). Среди остатков собаки найдены несколько целых нижних челюстей, шейных позвонков, ребер, костей таза и конечностей (бедренная, лучевая, локтевая берцовая, плечевая), один целый череп. Также встречаются фрагменты ребер,

трубчатых костей, позвонков, нижних челюстей, черепов и отдельных зубов. На одной из локтевых костей обнаружен перелом.

В фауне Рождественского городища остатки домашних видов (88%) преобладают над дикими (12%), что говорит о превалировании в хозяйстве древнего населения животноводства над промыслом.

Среди домашних видов большая часть остатков принадлежит крупному рогатому скоту (43%) и лошади (37%). Среди диких видов наиболее многочисленны остатки бобра (4%) и лося (3%).

Видовой состав диких млекопитающих из местонахождения отличается от современного состава фауны: ранее в состав фауны входил северный олень.

Библиографический список

1. Бачура О.П., Гасилин В.В., Косинцев П.А. Археозоологические материалы из городища Рождественское (планиграфический анализ) // Вестник Пермского научного центра. 2016. Вып.3. С. 30-35.
2. Белавин А.М., Крыласова Н.Б. Древняя Афкула: археологический комплекс у с. Рождественск. – Пермь: Перм. гос. пед. ун-т, 2008. – 603 с.
3. Гасилин В.В., Лобанова Т.В. Комплекс костных остатков животных из Рождественского городища в Прикамье (раскопки 2009 года) // Тр. камской археолого-этнографической экспедиции. Вып. VII: сб. науч. тр. Пермь, 2011. С. 126–129.
4. Косинцев П.А., Бачура О.П., Сарапулов А.Н. Фауна млекопитающих из местонахождения позднего голоцена Калинское (Пермское Предуралье) // Фауна Урала и Сибири. 2017. Вып.2. С.192-199.
5. Марвин М.Я. Фауна наземных позвоночных животных Урала. Свердловск, 1969. Вып.1. 155 с.
6. Цалкин В.И. Основные задачи изучения костей животных из раскопок памятников материальной культуры // КСИА. Вып. 58. М., 1955. С. 3–13.
7. Silver I. A. Ageing of Domestic Animals // Science in Archaeology: A Comprehensive Survey of Progress and Research. N. Y.: Basic Books, 1963. P. 250–268.

ИССЛЕДОВАНИЕ СИЛЫ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ПРИ ПРОЯВЛЕНИИ АГРЕССИИ НА ЧЕЛОВЕКА

Корнилова Е.А., Безволенко В.С.

ФГКВОУ ВО Пермский военный институт войск национальной гвардии, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: служебные собаки, нервная система, работоспособность

У специалистов кинологических подразделений войск национальной гвардии Российской Федерации повышенный интерес вызывают вопросы способности нервной системы служебных собак выносить значительные напряжения раздражительного и тормозного процессов и сохранять при этом нормальную работоспособность.

Зная тип высшей нервной деятельности собаки, становится возможным определить ее пригодность для служебного использования, категорию предназначения, выбрать оптимальную методику дрессировки. Однако, тип нервной деятельности животных – сложное комплексное явление, охватывающее многие функциональные особенности нервной системы, к которым относятся: ее сила и степень возбудимости, равновесие и подвижность процессов возбуждения и торможения. Такое исследование требует значительных затрат времени, наличие лаборатории и специального оборудования.

Изучение силы нервной системы, как одного из компонентов, не так затруднительно и возможно вне лабораторных условий более простыми способами. И.П. Павловым [1] были предложены специальные приемы для определения силы нервной системы животных. Эти методы позволяют выявить предел работоспособности нервной системы собаки, повышая напряжение раздражительного и тормозного процессов.

При оценке силы раздражительного процесса (возбудимости) применяют такие мероприятия, которые направлены на повышение возбудимости клеток коры головного мозга [2]. Показателем предела работоспособности нервных клеток по И.П. Павлову является способность их выдерживать длительное и концентрированное возбуждение или действие сверхсильного раздражителя, не переходя в тормозное состояние [3]. Другими словами, основная характеристика силы нервной системы есть сила раздражительного процесса. Слабость нервной системы характеризуется низким пределом работоспособности [4]. Для служебно-боевой деятельности предпочтительнее животные с сильной нервной системой [5]. Хотя к настоящему времени первоначальный стандарт определения силы изменился, исходный принцип определения тот же – установление предела работоспособности нервной системы при помощи ее возбуждения под действием сильных раздражителей [6].

Наше исследование направлено на определение возможности изучения силы нервной системы у служебных собак при проявлении агрессии на человека. На данном этапе мы постарались выявить, как долго собака остается деятельной и реагирующей на активные действия фигуранта, что опосредовано, дает возможность говорить о силе ее нервной системы.

Как известно, разные породы собак отличаются друг от друга по степени подвижности, активности, но и среди представителей одной породы достаточно высока изменчивость по данному признаку. Исследования многих ученых [7,8] показали, что индивидуальные вариации общих свойств нервной системы в достаточно высокой степени определяются генотипом, влияя на тип внешнего поведения животного. Таким образом, мы сможем говорить не только о фенотипическом проявлении свойств нервной системы конкретной особи, но и о возможном наследовании по данному признаку.

Объектами нашего исследования были служебные собаки (n=11 особей) учебного комплекса Пермского военного института, относящиеся к категории предназначения – патрульно-розыскные. Из них восемь собак породы немецкая овчарка, две бельгийские овчарки (малинуа) и один метис этих пород. Из одиннадцати особей десять были кобелями. Возраст животных, участвовавших в эксперименте от одного года до девяти лет. Изначально, собаки были разделены на четыре возрастные группы: один год, два-три года, пять лет и семь-девять лет. В дальнейшем, с учетом возрастных особенностей и значений коэффициента вариации выборочных совокупностей по показателям степени разнообразия признака, были выделены только три возрастные группы: «Младшая» (один год, n=2), «Средняя» (от двух до пяти лет, n=6) и «Старшая» (от семи до девяти лет, n=3).

Для изучения силы нервной системы у служебных собак мы применили методику, направленную на повышение возбудимости клеток коры головного мозга. В качестве сильного раздражителя, провоцирующего проявление агрессии, выступал активнодвигающийся перед привязанным животным фигурант с дрессировочным рукавом и стеклом. Все собаки относятся к категории патрульно-розыскных (предназначены для отражения нападения правонарушителей на граждан, задержания лиц, застигнутых при совершении преступления и пытающихся скрыться), таким образом, данный раздражитель для них является значимым. В задачи исследования входило измерение продолжительности во времени заинтересованности и двигательной активности собаки на энергичные действия

фигуранта. Фигурант двигался параллельно забору, к которому привязывалась собака (рис. 1), своими действиями вызывая желание собаки его достать, укусить, но, не давая ей возможности этого сделать. Хронометраж велся до момента, когда животное переставало реагировать на раздражитель в лице фигуранта, отворачивалось или ложилось на землю.



Рис. 1. Немецкая овчарка, привязанная к забору, в ожидании начала эксперимента

При появлении фигуранта с рукавом собаки проявляли заинтересованность без признаков агрессии (рис. 2).



Рис. 2. Собака проявляет интерес, пытается достать фигуранта

Активные действия человека приводили к тому, что собаки переходили в возбужденное состояние, пытались схватить за рукав, у большинства собак появлялось обильное слюнотечение (рис. 3). После того, как собака уставала, заинтересованность в фигуранте пропадала, животное отворачивалось, ложилось на землю.



Рис. 3. Выраженная агрессивная реакция собаки на действия фигуранта

Анализ результатов эксперимента показал, что средняя продолжительность активности собак по отношению к фигуранту составила $7,74 \pm 0,45$ минут, минимальное значение составило 5,03 минуты, максимальное – 10,4 минуты.

Качественный состав выборочной совокупности позволил сравнить результаты собак, относящихся к разным возрастам (рис. 4). Самую длительную ответную реакцию на действия фигуранта проявили служебные собаки двух-трех лет ($8,45 \pm 0,06$ минуты).

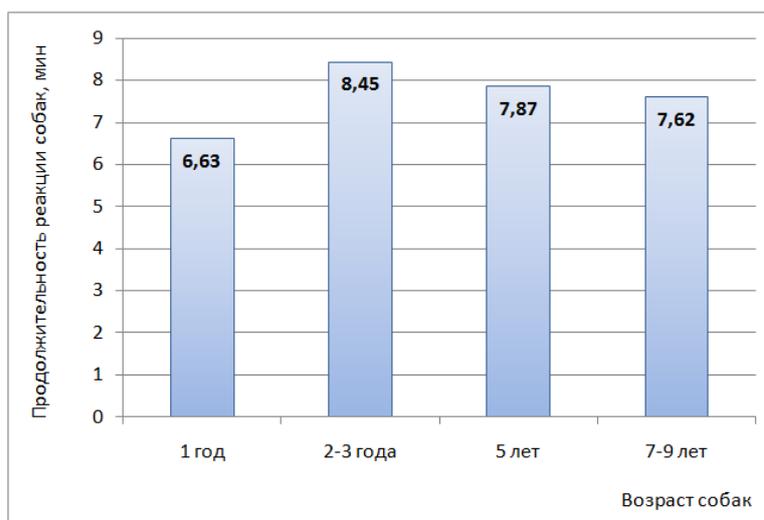


Рис. 4. Сравнение значений среднего арифметического собак разного возраста по результатам эксперимента

Сравнение результатов выделенных возрастных групп выявило, что активная реакция патрульно-розыскных собак увеличивается с возрастом («Младшая» $6,63 \pm 0,42$ минут, «Средняя» $8,16 \pm 0,36$ минут), а затем снижается («Старшая» $7,62 \pm 1,55$ минут). Необходимо отметить наличие достоверной разницы между младшей и средней возрастной группами ($t_d=2,77$, при $t_{st}=2,4$ и $p=0,05$) (рис. 5).

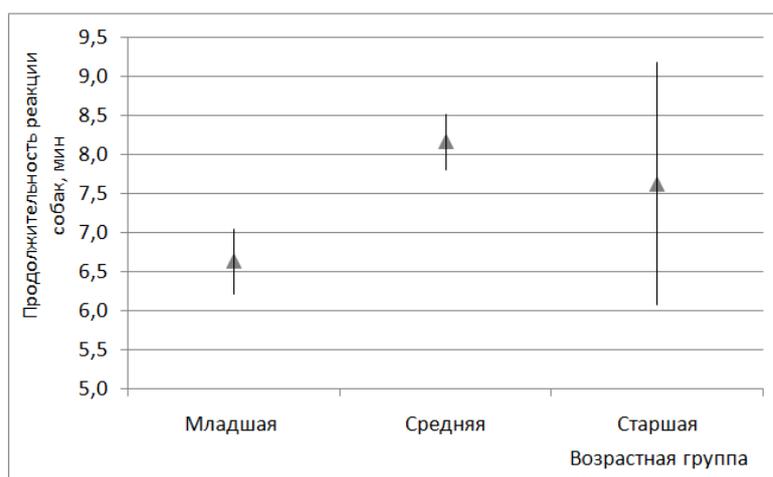


Рис. 5. Сравнение значений среднего арифметического собак разного возраста по результатам эксперимента с учетом ошибок

Сравнение по полу на данном этапе считаем не целесообразным, требуется увеличить количество исследованных животных разного пола.

В связи с тем, что бельгийские овчарки (малинуа) были представлены небольшим количеством особей, в сравнении участвовали немецкие овчарки той же возрастной группы. Оказалось, что между собаками данных пород нет достоверной разницы ($t_d=0,10$, при $t_{st}=2,8$ и $p=0,05$) по продолжительности активной ответной реакции на раздражитель (действия фигуранта). Немецкие овчарки ($n=4$) продемонстрировали время $7,25 \pm 0,49$ минут, а малинуа ($n=2$) – $7,05 \pm 2,02$ минуты.

Итак, мы выявили, как долго собака остается деятельной и реагирующей на активные действия фигуранта, что опосредовано, дает возможность говорить о силе ее нервной системы. Считаем возможным косвенно судить о силе нервной системы у служебных собак патрульно-розыскной категории предназначения по длительности проявления агрессии на человека. На следующем этапе работы мы оценим возможную корреляцию между полученными результатами эксперимента и работоспособностью овчарок.

Библиографический список

1. Павлов И.П. Условный рефлекс // Физиол. журн. –1935. – Т. 19. – Вып. 1. – С. 261-275.
2. Крушинский Л.В., Меркурьева Е.К., Израилевич И.Е. Служебная собака. М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1952 – 618 с. URL: <http://kinlib.ru/books/item/f00/s00/z0000018/st037.shtml>
3. Павлов И.П. Двадцатилетний опыт объективного изучения высшей нервной деятельности (поведения) животных. – М.: Наука, 1973. – 659 с.
4. Мурик С. Э. Свойства нервной системы и темперамент: учеб. пособие / С. Э. Мурик. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2008. – 188 с. URL: <http://www.fiziolog.isu.ru/murik/Lit.files/temperament.pdf>
5. Мазовер А.П. Племенное дело в служебном собаководстве. Издание 2-е, переработанное и дополненное. Под редакцией Н.Д. Потемкина. – М.: ДОСААФ, 1960. – 268 с.
6. Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии / Отв. ред. Д.А. Флесс. Изд. 2-е. – М.: ЛЕНАНД, 2019. – 266 с.
7. Колесников М.С. Особенности высшей нервной деятельности нескольких поколений собак слабого типа. Рефер. науч. иссл. работ за 1947 г., Акад. мед наук СССР, 1947, Вып. 1 (отделен. биол. наук).

8. Крушинский Л.В. Наследование пассивно-оборонительного поведения (трусости) в связи с типами нервной системы у собак // Труды Ин-та эволюционной физиологии и патологии высшей нервной деятельности им. акад. И.П. Павлова (Колтуши). – 1947. – Т. 1.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛЯТОВ *FUSARIUM* SPP., ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ КАРТОФЕЛЯ

Костенникова З.С., Гритчина Т.Е., Акосах Й.А., Марданова А.М.

ФГАОУ ВО Казанский (приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, г. Казань, Россия

Ключевые слова: *Fusarium*, целлюлаза, внеклеточная активность.

Введение. *Fusarium* представляет собой род нитчатых анаморфных аскомицетовых грибов, повсеместно распространенных в природе [1, 2]. Эти грибы привлекают пристальное внимание исследователей как фитопатогены сельскохозяйственных растений, а также как продуценты целлюлаз, играющих огромную роль в круговороте веществ в природе и имеющих огромный потенциал использования [3]. Эти ферменты имеет широкое промышленное применение в различных областях, начиная от пищевой промышленности, сельского хозяйства, получения биоэтанола, пивоварения, производства тканей, моющих средств, животных кормов, заканчивая, целлюлозно-бумажной промышленности [4]. Известно, что грибы и актиномицеты являются наиболее эффективными продуцентами этих важных ферментов, а их культивирование является наименее затратным процессом при промышленном производстве целлюлаз [5]. В связи с этим, поиск и характеристика новых штаммов рода *Fusarium* с высокой продукцией целлюлазной активностью является актуальной проблемой.

Целью работы явилось выделение из ризосферы картофеля и молекулярно-генетическая идентификация штаммов *Fusarium* с высокой целлюлазной активностью.

Материалы и методы. Микромицеты рода *Fusarium* были выделены из ризосферы растений картофеля сорта Зекура, которые выращивались на опытных полях ФГБНУ «ТатНИИСХ» (Республика Татарстан, Лаишевский р-н, Большекабанское сельское поселение). Корни растений освобождали от почвы встряхиванием, оставляя приблизительно 1 мм почвы, прикрепленной к корням. Затем корни помещали в колбы с 50 мл стерильного фосфатно-буферного солевого раствора (PBS) и интенсивно перемешивали стерильным пинцетом, чтобы смыть всю почву с корневых поверхностей. Почву, смытую с поверхности корней, переносили в 50-мл пробирки Falcon и затем готовили серию разведений почвенной суспензии (до 10^{-3}). Суспензию по 0.1 мл с разведением в 10^2 - 10^3 раз высевали газонем на агаризованную среду Чапека-Докса (АЧД). Для получения чистых культур микромицетов рода *Fusarium* пересевали колонии с характерной морфологией 2-3 раза на стерильные среды АЧД. Культуры грибов выращивали в течение 7 суток при 28-29°C, а затем хранили при 4 °C.

ДНК изолятов выделяли фенол-хлороформным методом и использовали для последующей амплификации консервативных участков ITS1 и ITS4. Данные сиквенсов аннотировали с помощью биоинформатической платформы BLAST.

Качественно целлюлазную активность определяли путем посева культур уколом на агаризованные селективные питательные среды, содержащие в качестве источника углерода и субстрата для ферментов натриевую соль карбоксиметил-целлюлозы (Na-КМЦ) в концентрации 0.05–1.0 %. Посевы культивировали в термостате при 28°C в течение 72

часов. Формирование зоны просветления вокруг колоний свидетельствовало о продукции грибами целлюлазы

Для количественного анализа целлюлазной активности грибы культивировали глубинным методом [6]. Культуральную жидкость отбирали каждые 24 часа и центрифугировали при 3 тыс. об/мин в течение 7 мин.

Общее содержание внеклеточного белка в неочищенных экстрактах определяли по методу Брэдфорда [7].

Результаты и обсуждение. Из ризосферы картофеля сорта Зекура было выделено 5 изолятов микромицетов с типичной морфологией, характерной для представителей рода *Fusarium*. Скрининг изолятов по характеру роста на среде с Na-КМЦ позволил отобрать для дальнейшей характеристики два изолята с наиболее высокой целлюлазной активностью, обозначенные как rZrO83 и rZrO84.

Результаты молекулярно-генетической идентификации штаммов на основании секвенирования амплификатов ITS участков представлены в таблице 1. BLAST-анализ нуклеотидных последовательностей выявил 98-100% гомологию со штаммами определенных видов из базы данных. Таким образом, изолят rZrO83 идентифицирован как штамм *F. solani*, а изолят rZrO84 – штамм *F. oxysporum*. Полученные результаты подтверждают известный факт о том, что область ITS рДНК является надежным локусом для секвенирования и молекулярного анализа микромицетов рода *Fusarium*.

Таблица 1

Молекулярно-генетическая идентификация до вида изолятов микромицетов по генам ITS

№	Изоляты	Праймер	Гомология, %	Видовая принадлежность
1.	rZrO 83	ITS1	99.40	<i>Fusarium solani</i>
	rZrO 83	ITS4	99.81	<i>Fusarium solani</i>
2.	rZrO 84	ITS1	99.81	<i>Fusarium oxysporum</i>
	rZrO 84	ITS4	98.39	<i>Fusarium oxysporum</i>

Сравнительный анализ изолятов позволил установить, что изолят rZrO83 обладает более высокой целлюлазной активностью, чем изолят rZrO84, что коррелирует с более высокой скоростью роста микромицета (рисунок 1).

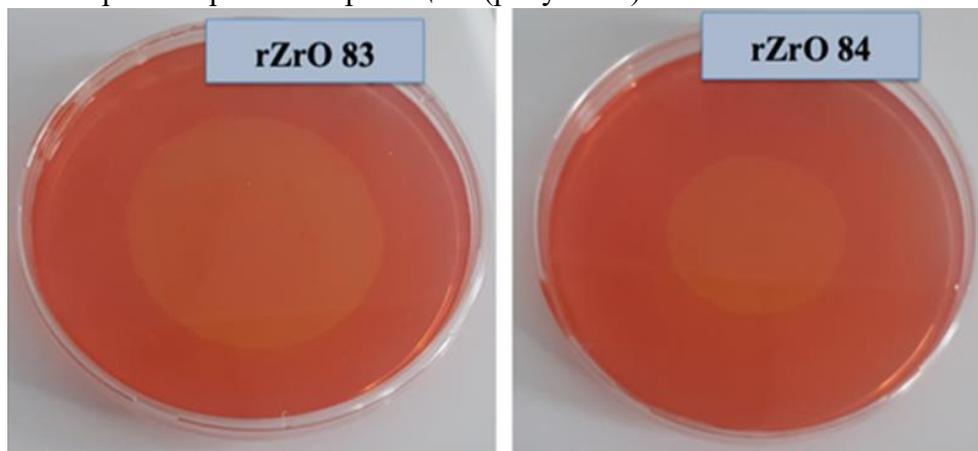


Рисунок 1. Оценка целлюлазной активности на агаризованной среде, содержащей в качестве источника целлюлозы карбоксилметил-целлюлозу (1.0%). Культивирование в течение 72 ч при 28 °С.

С использованием глубинного метода культивирования получили надосадочную культуральную жидкость (КЖ) грибов, которую использовали в качестве сырого ферментативного экстракта для анализа активности внеклеточной целлюлазы. Сравнительный анализ роста культур (по сухому весу) и по содержанию внеклеточного белка показал, продукция биомассы и общего внеклеточного белка на жидкой среде штаммом rZrO84 выше, чем у штамма rZrO83 (таблица 2).

Таблица 2

Рост и содержание суммарного белка в культуральной жидкости *Fusarium* spp.

Изолят	Рост культуры (сухой вес, г)	Общий белок (мг/мл)	Продуктивность по белку, усл.ед.
rZrO83	0.176±0.020	1.35±0.09	7.69±0.37
rZrO84	0.211±0.015	2.47±0.04	11.73±0.44

При использовании в качестве субстрата бумаги Ватман показали, что на 96 час роста целлюлазная активность в культуральной среде изолята rZrO83 составила 3.08 ед. ФБ/мл и оказалась выше, чем у изолята rZrO84, активность которого не превышала 0.65 ед. ФБ/мл. При использовании в качестве субстрата КМЦ активность изолята rZrO84 также была выше, чем у rZrO83 и составила 55.47 ед/г против 24.18 ед/г (таблица 3, рисунок 2).

Таблица 3

Оценка целлюлазной активности изолятов *Fusarium* spp. на разных субстратах

Изолят	Субстрат		
	Бумага Ватман (ед. ФБ/мл)	КМЦ	
		Активность (ед./мл)	Удельная активность (ед/г)
rZrO83	3.08±0.21	9.762±0.23	55.47±1.34
rZrO84	0.65±0.09	5.102±0.37	24.18±0.85

Результаты представлены как SD±SEM.

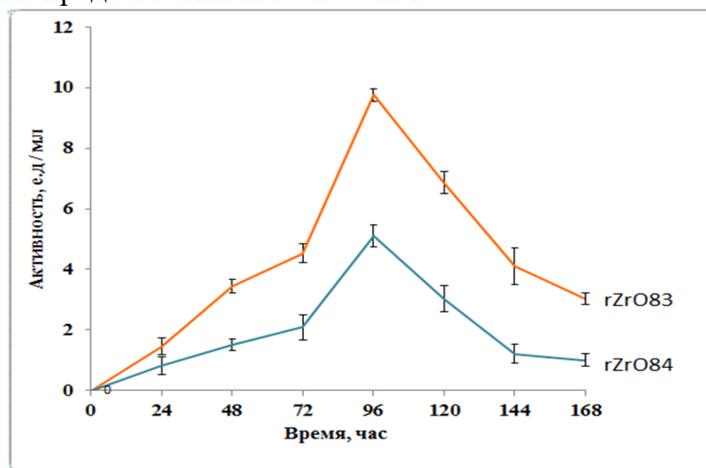


Рисунок 2. Динамика накопления внеклеточной КМЦ-азы при глубинном культивировании штаммов *Fusarium*.

Как видно из рисунка 2, на котором представлена динамика накопления внеклеточной КМЦ-азы при глубинном культивировании штаммов *Fusarium*, активность обоих штаммов проявляется уже на первые сутки, а пик приходится на четвёртые сутки роста.

При сравнении результатов, полученных с использованием в качестве субстрата бумаги Ватман ФБ, с данными литературы можно отметить, что целлюлазная активность исследуемых штаммов *F. solani* rZrO83 (3.08±0.21 ед/мл) и *F. oxysporum* rZrO84 (0.65±0.09

ед/мг) значительно превышает соответствующую активность других видов микромицетов, например, *Aspergillus ustus* (0.11 ± 0.04 ед/мг) и *Talaromyces brunneus* (0.44 ± 0.06 ед/мг) [8].

Эндогликозная активность исследуемых штаммов *F. solani* (9.762 ± 0.23 ед/мл) и *F. oxysporum* (5.102 ± 0.37 ед/мл) также выше, чем у других микромицетов. Так, например, соответствующая активность *Aspergillus ustus* составляла 4.76 ± 0.47 ед/мл, а *Talaromyces brunneus* – 1.87 ± 1.15 ед/мл [8].

Выводы. Из ризосферы картофеля выделены два изолята, идентифицированные как штамм *F. solani* rZrO83 и *F. oxysporum* rZrO84, обладающие высокой целлюлазной активностью. Максимальный уровень активности в среде достигается на 4 сутки при глубинном культивировании микромицетов. Активность *F. solani* rZrO83 достигает 9.762 ± 0.23 ед/мл, а *F. oxysporum* – 5.102 ± 0.37 ед/мл, что свидетельствует о том, что выделенные штаммы являются перспективными для промышленного производства целлюлазных ферментов. Дальнейшие исследования будут направлены на определение оптимальных условий для продукции целевых ферментов.

Работа поддержана грантом РФФИ № проекта 19-316-90028.

Библиографический список

1. Zhou Y., Zhou E., Cong Y et al. Structural basis of *Fusarium* myosin I inhibition by phenamacril // PloS Pathol. – 2020 - 16(3):e1008323. - doi: 10.1371 / journal.ppat.1008323, P.1-12.
2. Gordon T.R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome // Annu. Rev. Phytopathol. -2017. – V.55. – doi.org – 10.1146 – annurev-phyto-080615-095919. P.23-33.
3. Ariffin H. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3// International Journal of Engineering and Technology. – 2006. – V.3, I.1. – P. 47-53.
4. Левина Е.А., Атыкян Н.А., Ревин В.В. Влияние источников углеродного и азотного питания на биосинтез целлюлаз грибами *Lentinus tigrinus* ВКМ F-3616 D и *Trichoderma viride* ВКМ F-1131 // Вестник ВГУ, Серия: Химия, Биология, Фармация. – 2016. – №1. – С.85-93.
5. Kasai N., Konishi A., Iwai K. Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – V. 54 (17). – P. 6336 – 6342.
6. Changhe D., Wang X., Li M. Evaluation of six white-rot fungal pretreatments on corn stover for the production of cellulolytic and ligninolytic enzymes, reducing sugars, and ethanol // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – V.103, №14. - doi: 10.1007/s00253-019-09884-y. P.5641-5662.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V.72. – P. 248-254.
8. Paula C.C.P., Montoya Q.V., Meirelles L.A. High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (Catão cave) in Brazil // An. Acad. Bras. Ciênc. – 2019. – V.91 (3):e20180583. doi: 10.1590/0001-3765201920180583, – P.1-12

ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДОВ *STREPTOMYCES* И *RHODOCOCCLUS*, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО ОКСИДАТИВНОГО ФОНА

Краснова М.Е.¹, Переляева Е.В.^{1,2}, Моргунова М.М.^{1,2}, Бельшенко А.Ю.¹, Тимофеев М.А.¹, Аксёнов-Грибанов Д.В.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²ООО Гринтех Байкал, г. Иркутск, Россия

Ключевые слова: биотехнология, актинобактерии, кислород, озон, озеро Байкал

Окислительный стресс играет большую роль в развитии таких заболеваний, как ревматоидный артрит, рак, болезнь Альцгеймера и др. Вместе с тем, различные болезни сердечно-сосудистой системы могут быть связаны с патологическими изменениями, наблюдающимися из-за повреждения ДНК и белков в результате окислительного стресса [6]. Природные соединения, обладающие антиоксидантной активностью, способны вступать во взаимодействие со свободными радикалами. За счет этого происходит ингибирование процессов окисления клеточных структур, и, таким образом, антиоксиданты участвуют в профилактике и лечении различных заболеваний, связанных с окислительным стрессом [4, 5]. Бактерии синтезируют около 70% всех природных соединений, которые имеют важное значение в медицине, фармацевтике и сельском хозяйстве. Среди всего разнообразия микроорганизмов, способных к синтезу природных соединений, особое значение получили актинобактерии [2].

Особый интерес для поисковых исследований представляют микроорганизмы древних экосистем. Одной из таких экосистем выступает озеро Байкал. Экосистема озера Байкал характеризуется высоким процентом эндемичных организмов, низкой концентрацией минеральных солей, низкой температурой воды и экстремально высокой степенью насыщенности воды кислородом [1]. Именно такие условия среды обитания позволили микроорганизмам сформировать защитные механизмы к повышенному содержанию кислорода в среде. Несмотря на большие перспективы этого направления, к настоящему моменту на Байкале проведены лишь единичные исследования.

Целью исследования выступала оценка биотехнологического и антиоксидантного потенциала актинобактерий озера Байкал, культивируемых в условиях повышенного оксидативного фона – при повышенном содержании кислорода и озона.

В ходе эксперимента проводился пробоотбор байкальских эндемичных амфипод вида *Eulimnogammarus cyaneus* для выделения и культивирования актинобактерий. Актинобактерий культивировали в стандартных условиях естественной аэрации (контроль), в условиях повышенного содержания кислорода в колбе (экспериментальные условия 1), а также условиях совместного повышенного содержания кислорода и озона (экспериментальные условия 2). Оценка состава природных соединений, синтезируемых актинобактериями, проводили при помощи подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии высокого разрешения и использования базы данных Dictionary of Natural products.

В ходе настоящего исследования впервые разработан эксперимент по оценке воздействия кислорода и озона на адаптивные способности штаммов актинобактерий. При этом впервые для микроорганизмов озера Байкал проведена оценка биотехнологического потенциала с применением современных подходов хроматографии и хромато-масс-

спектрометрии высокого разрешения. К настоящему времени оценена биосинтетическая активность экстрактов культуральной жидкости штаммов *Streptomyces* sp. IB2019M2C-2 и *Rhodococcus* sp. IB2019M7C-2.

Установлено, что в условиях стандартного культивирования и культивирования в условиях повышенного содержания кислорода, штамм *Streptomyces* IB2019M2C-2 синтезирует 176 природных соединений, 94 из которых предварительно не обнаружены в базе данных Dictionary of Natural Products (CRC press, 2019) и, по-видимому, представляются новыми природными метаболитами.

Соединение с молекулярной массой 600,3486 Да, идентифицированное как Nocardamine (CAS № - 26605-16-3) [7], согласно базе данных DNP является антиоксидантом, сидерофором и антибиотиком, а также индуцирует морфологические изменения в клетках насекомых [3]. Данное соединение активно синтезируется штаммом с 1 по 3 неделю экспериментального воздействия кислорода и озона.

Установлено, что для штамма *Streptomyces* sp. IB2019M2C-2 в экспериментальных условиях происходит значительная индукция синтеза природных соединений, по сравнению с условиями естественной аэрации (рис. 1). В составе культуральной жидкости превалирует соединение Streptomyceamide B (CAS № - 910541-77-4). Однако также обнаружены и иные известные природные соединения, в том числе Arginomycin (CAS № - 106133-33-9), Nivelactam (CAS № - 1886022-43-0), Antimycin A (CAS № - 522-70-3).

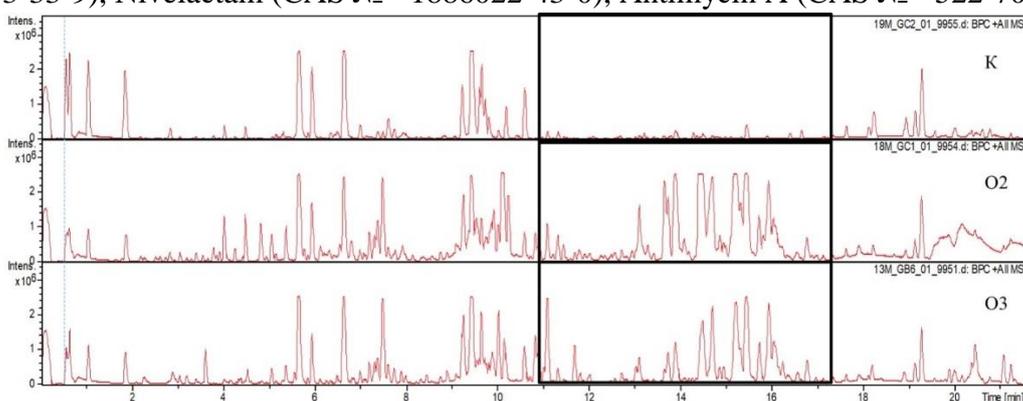


Рис. 1. Хроматограмма масс природных соединений, синтезируемых штаммом *Streptomyces* sp. IB2019M2C-2

Примечание – сверху – вниз: К – контроль, O₂ – условия повышенного содержания кислорода, O₃ – условия повышенного содержания кислорода и озона

При оценке биотехнологического потенциала с применением современных подходов хроматографии и хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения для штамма *Rhodococcus* sp. IB2019M7C-2 установлено, что в условиях контрольного культивирования и культивирования в условиях повышенного содержания кислорода, штамм *Rhodococcus* sp. IB2019M7C-2 синтезирует 89 природных соединений, 88 из которых не обнаружены в базе данных Dictionary of Natural Products (CRC press, 2019). Единственное природное соединение идентифицировано как Octahydro-7a-methyl-1-(1-methyl-2-oxopropyl)-5-oxo-1H-indene-4-propanoic acid (CAS № - 77814-24-5) (рис. 5, рис.6). Согласно базе данных Dictionary of Natural Products данное соединение обладает противогрибковой активностью.

Начиная со времени удерживания 12,6 по 16,0 в экспериментальных условиях для штамма *Rhodococcus* sp. IB2019M7C-2 происходит небольшая индукция синтеза соединений 519,3330 Да, 325,3710 Да, 278,2250 Да по сравнению с условиями естественной аэрации (рис. 2).

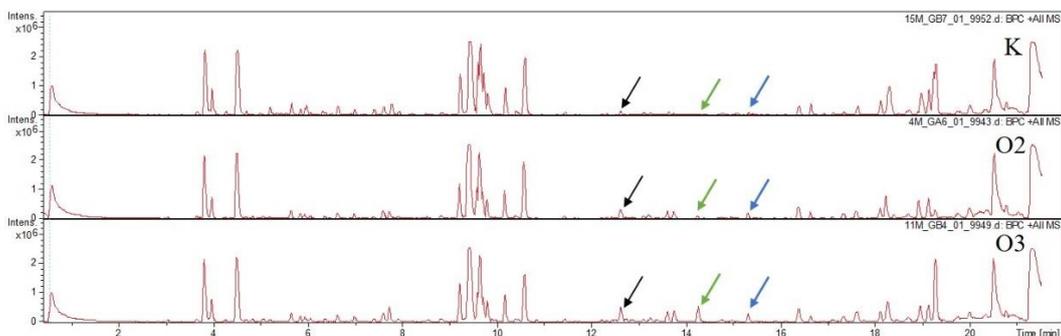


Рис. 2. Хроматограмма масс природных соединений, синтезируемых штаммом *Rhodococcus* sp. IB2019M7C-2

Примечание – сверху – вниз: К – контроль, O₂ – условия повышенного содержания кислорода, O₃ – условия повышенного содержания кислорода и озона.

Таким образом, впервые была проведена работа по влиянию кислорода и озона на антиоксидантный потенциал байкальских микроорганизмов. Было показано изменение синтеза соединений в контрольных и экспериментальных условиях и наличие метаболических перестроек в ответ на предъявляемое воздействие. Данный факт может указывать на участие природных соединений в защите микроорганизмов от действия активных форм кислорода.

Исследование проведено при частичной финансовой поддержке грантов РФФ (проект 20-76-00001) и РФФИ (проект 18-34-00294, 18-29-05051).

Библиографический список

1. Тимошкин О.А. К вопросу о важности изучения мелководной зоны Байкала. В кн.: Аннотированный список фаун озера Байкал и его водосборного бассейна / О. А. Тимошкин – Новосибирск: Наука, 2009. – С. 705–707
2. Gao B., Gupta R. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2012. – V. 76. – № 1. – P. 66-112.
3. Matsubara K., Sakuda S., Kondo T., Tanaka M., Nishimura T., Suzuki A. Morphological changes in insect BM-N4 cells induced by nocardamine // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2014. – V. 62. – № 10. – P. 2049-2051
4. Mohammadipanah F., Momenilandi M. Potential of rare actinomycetes in the production of metabolites against multiple oxidant agents. // *Pharmaceutical Biology*. – 2018. – V. 56. – № 1. – P. 51-59
5. Monciardini P., Iorio M., Maffioli S., Sosio M., Donadio S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources // *Microbial biotechnology*. – 2014. – V. 7. – № 3. – P. 209–220.
6. Niki E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2010. – V. 49. – № 4. – P. 503-515.
7. Ueki M., Suzuki R., Takamatsu S., Takagi H., Uramoto M., Ikeda H., Osada H. Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis* // *Actinomycetologia*. – 2009. – V. 23. – № 2. – P. 34-39.

БАРКОДИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ АМФИБИОТИЧЕСКИХ И ВОДНЫХ ЧЛЕНИСТОНОГИХ АРХИПЕЛАГА НОВАЯ ЗЕМЛЯ И ПРИЛЕГАЮЩИХ ТЕРРИТОРИЙ

Крашенинников А.Б.

ПГНИУ, г. Пермь, Россия

ИБПС ДВО РАН, г. Магадан, Россия

Ключевые слова: архипелаг Новая Земля, о. Вайгач, Югорский п-ов, членистоногие, COI

В ходе экспедиции на о. Южный архипелага Новая Земля, о. Вайгач и материковое побережье в районе пролива Югорский шар в 2015 году А.Б. Крашенинниковым собран обширный материал амфибиотических и водных членистоногих, обитающих в озерах, реках и ручьях. Кроме личиночной стадии развития, удалось собрать имаго амфибиотических насекомых, что позволило определить виды. В дальнейшем проведено изучение локуса COI (цитохромоксидазы I) у достоверно идентифицированных экземпляров.

Методы исследования. Экземпляры фиксирован этанолом (96%). ДНК выделена из груди и брюшка с помощью набора Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit. Выделенная ДНК хранится в Музее естественной истории университета г. Осло (Норвегия).

Стандартная полимеразная цепная реакция проводилась в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1,25 U Platinum® Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen), 1×PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 1,25 мкл каждого праймера, 3 мкл суммарной клеточной ДНК и 0,06 мкл BS A (бычий сывороточный альбумин, Bovine Serum Albumin solution, концентрация 20 мг/мл). Для амплификации последовательности митохондриального гена COI (цитохромоксидазы I) и последующего секвенирования использованы праймеры LCO1490 и HCO2198 [2]. Амплификацию проводили при следующих температурных условиях: начальная денатурация ДНК – 2 мин при 94° С; 35 циклов: денатурация – 1 мин при 94°, отжиг – 30 с при 45° С; элонгация – 2 мин при 72°С; последний цикл элонгации – 10 мин при 72° С. Таргетный участок COI был амплифицирован и секвенирован в перекрывающихся фрагментах (Elven et al., 2012).

Продукты амплификации были очищены с помощью набора ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA). Очищенные продукты были секвенированы методом Сэнгера в обоих направлениях с использованием концевых праймеров с помощью ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems) на ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Секвенирование ДНК проведено с использованием ресурсов DNA lab of the Natural History Museum, University of Oslo.

Выравнивание последовательности

Сборка контигов выполнена с использованием программы CodonCode Aligner v3.0 (CodonCode Corporation), выравнивание последовательностей – с помощью MEGA-X.

Все экземпляры монтированы в сандаракový бальзам и хранятся в ИБПС ДВО РАН (г. Магадан). Данные о дате, месте сбора, номеру последовательности в GenBank приведены в таблице 1.

Все полученные данные будут использованы в дальнейшем для точной видовой идентификации водных и амфибиотических членистоногих в арктической зоне России.

Таблица 1

Результаты баркодирования некоторых водных и амфибиотических беспозвоночных с архипелага Новая Земля и прилегающих территорий

Номер в GenBank/ шифр в коллекции	Таксон	Дата сбора	Широта / долгота	Описание места сбора
МК592903 ССК 14/19	<i>Allocladius nanseni</i>	07.08.2015	N 69,86003 E 59,13342	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья
МК592906 ICK 8/3	<i>Baetis macani</i>	07.08.2015	N 69,86003 E 59,13342	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья
МК592899 ICK 8/4	<i>Baetis macani</i>	02.08.2015	N 70,55328 E 55,16339	архипелаг Новая Земля, о. Южный, мыс Саханина, ручей, вытекающий из озера, окрестности избы "Белой"
МК592896 ICK 8/5	<i>Baetis macani</i>	08.08.2015	N 69,60736 E 60,21164	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136317 ICK 11/2	<i>Branchinecta paludosa</i>	27.07.2015	N 70,55472 E 55,14750	архипелаг Новая Земля, о. Южный, п-ов Саханина
MW136296 ССК 301/1	<i>Chironomus sp.</i>	28.07.2015	N 70,547222 E 55,178278	архипелаг Новая Земля, о. Южный, мыс Саханина, изба "Белая"
MW136297 ССК 301/2	<i>Chironomus sp.</i>	28.07.2015	N 70,547222 E 55,178278	архипелаг Новая Земля, о. Южный, мыс Саханина, изба "Белая"
MW136298 ССК 303/3	<i>Corynoneura arctica</i>	07.08.2015	N 69,860028 E 59,133417	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья
MW136309 ССК 303/2	<i>Corynoneura arctica</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136314 ССК 302/1	<i>Corynoneura scutellata</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136312 ССК 302/2	<i>Corynoneura scutellata</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136315 ССК 302/3	<i>Corynoneura scutellata</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136310 ССК 302/4	<i>Corynoneura scutellata</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136313 ССК 302/5	<i>Corynoneura scutellata</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
МК592892 ССК 231/4	<i>Gymnometriocnemus (Raphidocladius) brumalis</i>	08.08.2015	N 69,60736 E 60,21164	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136318 ICK 10/1	<i>Lepidurus arcticus</i>	27.07.2015	N 70,55472 E 55,14750	архипелаг Новая Земля, о. Южный, п-ов Саханина
МК592897 ICK 7/1	<i>Limnephilus picturatus</i>	08.08.2015	N 69,60736 E 60,21164	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
МК592898 ССК 76/5	<i>Limnophyes brachyotomus</i>	03.08.2015	N 70,54722 E 55,17828	архипелаг Новая Земля, о. Южный, мыс Саханина, изба "Белая"
MW136302 ССК 76/4	<i>Limnophyes brachyotomus</i>	07.08.2015	N 69,860028 E 59,133417	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья

Номер в GenBank/ шифр в коллекции	Таксон	Дата сбора	Широта / долгота	Описание места сбора
МК592893 ССК 83/4	<i>Limnophyes pumilio</i>	08.08.2015	N 69,60736 E 60,21164	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
МК592909 ИСК 5/8	<i>Mesocapnia variabilis</i>	02.08.2015	N 70,57386 E 55,19256	архипелаг Новая Земля, о. Южный, п-ов Саханина
MW136300 ССК 259/2	<i>Micropsectra recurvata</i>	07.08.2015	N 69,860028 E 59,133417	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья
MW136299 ССК 214/4	<i>Orthocladius (Eudactylocladius) subletteorum</i>	07.08.2015	N 69,860028 E 59,133417	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья
MW136311 ССК 214/1	<i>Orthocladius (Eudactylocladius) subletteorum</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136304 ССК 250/1	<i>Paratanytarsus setosimanus</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136305 ССК 108/11	<i>Psectrocladius (Allopsectrocladius) obvius</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
MW136301 ССК 246/1	<i>Tanytarsus lestagei</i>	07.08.2015	N 69,860028 E 59,133417	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья
MW136303 ССК 247/4	<i>Tanytarsus mendax</i>	08.08.2015	N 69,607361 E 60,211639	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
МК592910 ССК 194/4	<i>Trichotanypus christmasus</i>	07.08.2015	N 69,86003 E 59,13342	о. Вайгач, п-ов Лямчин, окрестности м. Большой Лямчин Нос, среднее течение ручья
МК592895 ССК 234/5	<i>Tvetenia duodenaria</i>	08.08.2015	N 69,60736 E 60,21164	Югорский п-ов, мыс Белый Нос, безымянное озеро, окрестности полярной станции Белый Нос
МК592900 ССК 234/4	<i>Tvetenia duodenaria</i>	27.07.2015	N 70,54722 E 55,17828	архипелаг Новая Земля, о. Южный, мыс Саханина, изба "Белая"
МК592904 ССК 234/2	<i>Tvetenia duodenaria</i>	02.08.2015	N 70,55328 E 55,16339	архипелаг Новая Земля, о. Южный, мыс Саханина, ручей, вытекающий из озера, окрестности избы "Белой"
МК592908 ССК 234/3	<i>Tvetenia duodenaria</i>	02.08.2015	N 70,57386 E 55,19256	архипелаг Новая Земля, о. Южный, п-ов Саханина

Благодарности. Молекулярная часть работы была выполнена в молекулярной лаборатории Музея Естественной Истории университета Осло, Норвегия. Финансирование за счет гранта HNP-2013/10118 В.И. Гусарова (университет Осло), полученного от Норвежского Центра по международному сотрудничеству в области образования (программа по Крайнему Северу).

Полевые работы проводились в рамках экспедиции «Открытый океан: Архипелаги Арктики - 2015» при поддержке Ассоциации «Морское наследие: исследуем и сохраним». Автор искренне признателен М. В. Гаврило за организацию экспедиции.

Библиографический список

Elven, E., Bachmann, L. & Gusarov V. I. (2012) Molecular phylogeny of the Athetini–Lomechusini–Ecitocharini clade of aleocharine rove beetles (Insecta). —*Zoologica Scripta*, 41, 617–636.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ИНДЕНА АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCLUS*

Кузнецова Д.С.¹, Куюкина М. С.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

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

Ключевые слова: родококки, биотрансформация, ароматические углеводороды, инден, фенол, соокисление

Актинобактерии рода *Rhodococcus* способны метаболизировать ароматические углеводороды и их производные. Начальный этап аэробной биотрансформации углеводородов включает моно- или диоксигенирование с образованием спиртов или диолов [1]. Инден является двуциклическим ароматическим углеводородом с молекулярной формулой C₉H₈. Он состоит из бензольного кольца, конденсированного с циклопентеновым кольцом. Инден с помощью микроорганизмов может быть преобразован в различные индандиолы, два из которых являются потенциальными предшественниками индинавира сульфата, ингибитора протеазы ВИЧ. Поскольку инден является высокотоксичным соединением [2, 3], актуален поиск бактериальных штаммов, устойчивых к его высоким концентрациям. Нами ранее [3] был отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360, сохраняющий жизнеспособность в присутствии повышенной (до 5,0 об.%) концентрации индена.

Цель исследования – оценка способности коллекционного штамма *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 к трансформации индена в различных условиях культивирования.

В работе использовали штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM # 768; www.iegmcol.ru/strains). Культивирование родококков проводили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл, в которые вносили 50 мл минеральной среды RS, 3 мл клеточной суспензии (ОП600=2,0) и 2,5 мл индена (95%, Energy Chemical, Китай) до конечной концентрации 0,5 об. %. В отдельные колбы дополнительно вносили фенола до конечной концентрации 0,05 об. %. Обернутые фольгой колбы для предотвращения фотоокисления индена инкубировали на орбитальном шейкере Certomat IS (“Sartorius”, Германия) при 160 об/мин, 28 °С в течение 14 сут. Концентрацию индена, фенола и продуктов их биотрансформации в культуральной среде определяли ежедневно с помощью ВЭЖХ [4]. Использовали хроматограф LC Prominence (Shimadzu, Япония), оборудованный колонкой с обращенно-фазовым сорбентом Discovery® C18, 250 × 4,60 мм 5 мкм (Supelco Analytical, США) и диодноматричным детектором. Подвижная фаза: 10 мМ КН₂РO₄ (рН 7,0) – ацетонитрил в соотношении 40:60. Режим элюирования изократический, скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин, длина волны детектирования – 220 нм; объем вводимой пробы – 20 мкл; температура термостата колонки – 40°С. Время удерживания DCF 12,2 ± 0,03 мин. Для выделения индена, фенола и их метаболитов к постферментационной среде родококков добавляли эквивалентный объем смеси ацетонитрила и изопропанола (1:1). Экстракты центрифугировали 14000 об/мин в течение 20 мин, надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр (FilterBio, Китай) с диаметром пор 0,20 мкм. В качестве контролей использовали: (1) раствор индена в

минеральной среде RS (0,5 об. %), (2) раствор фенола в минеральной среде RS (0,05 об. %) – абиотические контроли; (3) среду RS с клетками родококков – биотический контроль.

По нашим данным (рис. 1), родококки способны к использованию индена в качестве единственного источника углерода и энергии, однако его биотрансформация осуществлялась на 5% интенсивнее в условиях соокисления с другим ароматическим субстратом – фенолом. При этом была зарегистрирована минимальная (до 4%) убыль фенола, который, очевидно, выступал в роли индуктора в процессе окисления индена, поскольку известно [5-7], что бактерии рода *Rhodococcus* обладают широким метаболическим потенциалом и способны к деструкции фенола и его производных. Несмотря на инкубирование в темноте, отмечено интенсивное абиотическое окисление индена, концентрация которого уже на вторые сутки снизилась в 25 раз. В опытных вариантах с клеточной суспензией аналогичная интенсивность биоокисления индена достигалась только на 14-е сутки.

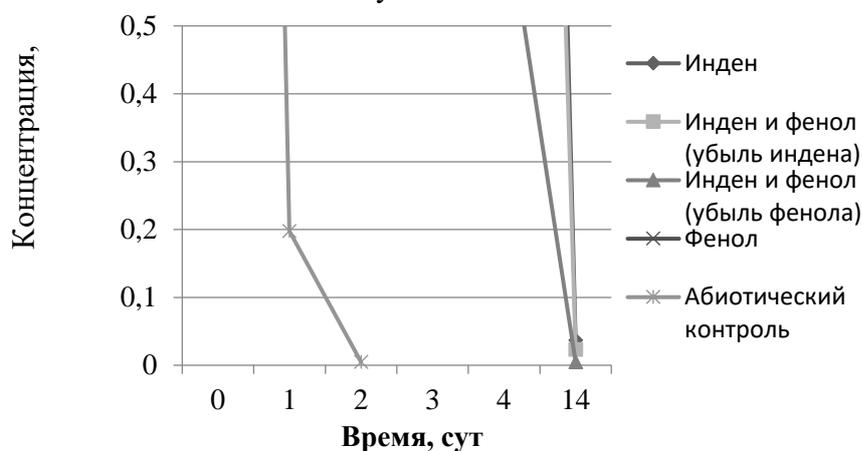


Рис. 1. Биотрансформация ароматических субстратов клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360.

С помощью ВЭЖХ обнаружены 4 потенциальных продукта биотрансформации индена (соответствующие значения $R_t = 6,1; 8,9; 10,2; 11,4$), которые пока не удалось точно идентифицировать (рис. 2). По данным литературы [2] предполагается, что два из них – это 1-кето-2-гидроксииндан ($R_t = 6,1$) и 1-инданон ($R_t = 8,9$).

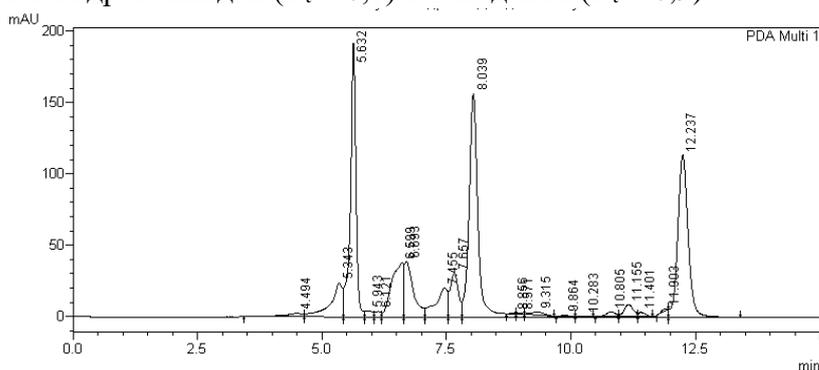


Рис. 2. Хроматограмма продуктов биотрансформации индена ($R_t=12,2$) клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 на 14-е сут инкубирования.

Таким образом, в результате проведенного исследования экспериментально обоснована способность актинобактерии *R. rhodochrous* ИЭГМ 1360 к биотрансформации индена в условиях его использования в качестве единственного источника углерода и энергии, а также при соокислении с фенолом.

Исследование выполнено в рамках госзаданий Минобрнауки РФ (AAAA-A19-119112290010-7 и FSNF-2020-0008) и поддержано грантом РФФИ 18-29-05006.

Библиографический список

1. Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24 / S.L. Treadway [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 51. P. 786 – 793.
2. Fed-batch bioconversion of indene to cis-indandiol A. Amanullah [et al.] // *Enzyme Microbial Technology.* 2002. V. 31. P. 954–967.
3. Kuyukina M., Andreeva D., Sandalli S., Ivshina I. Screening of *Rhodococcus* actinobacteria from the IEGM collection for their resistance to indene // *Proceedings of the 2nd International Scientific Conference “High Technologies Improving Quality of Life”*. Perm, 2018. P. 296-298.
4. Chartrain M. [et al.]. Bioconversion of indene to *cis*-(1S, 2R)-indandiol and *trans*-(1R, 2R)-indandiol by *Rhodococcus species* // *J. Ferment. Bioeng.* 1998. V. 86. P. 550–558.
5. Коробов В. В., Журенко Е. Ю., Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Маркушева Т. В. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола *Rhodococcus erythropolis* 17S для очистки промышленных стоков // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2017. Т. 72. С.235-240.
6. Кувичкина Т. Н., Носулич В. Е., Капаруллина Е. Н. и др. Окисление фенола и катехола иммобилизованными клетками актинобактерий *Rhodococcus gordoniae* leto // *Естественные науки.* 2019. Вып. 4. С. 28-37.
7. Шумкова Е. С., Соляникова И. П., Плотникова Е. Г., Головлева Л. А. Разложение фенола штаммом *Rhodococcus opscus* 1G // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2009. Т. 45. С. 51-57.

АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СЕЛЕНОБОГАЩЕННЫХ ПРОРОСТКОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Лапкина Е.З., Савельева Е.Е., Булгакова Н.А.

ФГБОУ ВО "Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого" Минздрава России

Ключевые слова: селенит натрия, селен, антирадикальная активность,ДФПГ.

Селен является одним из важнейших микроэлементов необходимых для нормального функционирования организма человека с уникальными биологическими функциями, одной из которых является антиоксидантная защита от действия свободных радикалов. Селен входит в активный центр ферментов системы антиоксидантно-антирадикальной защиты организма, метаболизма нуклеиновых кислот, липидов, гормонов (глутатионпероксидазы, йодотиронин-дейодиназы, тиоредоксинредуктазы и др.). Недостаток селена в организме вызывает развитие ряда заболеваний (некроз печени, болезни Кешана, Кашина-Бека), в основе которых лежит нарушение механизмов нейтрализации свободнорадикальных процессов [1, 2]. Неорганические соединения селена, такие как селенит натрия, могут вызывать аллергические реакции и обладать токсичностью, что ограничивает их применение [3]. В растениях селен преобладает в форме селенметионина, что определяет перспективу использования селенобогатых растительных объектов в качестве доступного источника микроэлемента.

Зерновые культуры вносят большой вклад в суточный рацион человека. Проростки зерновых культур являются функциональным продуктом питания, содержащим высокую

концентрацию витаминов, белков, ферментов и антиоксидантов. Состав семян меняется во время прорастания, так изменяется количество белковых фракций, доля азотсодержащих фракций смещаются в сторону меньших белковых фракций, олигопептидов и свободных аминокислот. Во время прорастания происходят изменения количества аминокислот, образуются небелковые аминокислоты. Вследствие этих изменений биологическая ценность белка проростков возрастает [4].

Последние исследования указывают на значительную роль селенобогатенных проростков в профилактике раковых заболеваний и повышении акнтиоксидантного статуса населения [5].

Так, установлено, что экстракт селенсодержащих проростков брокколи стимулирует в 3,7–5 раз активность клеточных ферментов. [6]. Изучена активность глутатионпероксидазы в печени при употреблении селенобогатенных проростков тыквы и редиса [7].

В наших исследованиях использовали зерновки пшеницы, овса и ржи, предназначенные для проращивания в домашних условиях и употребления в пищу человеком в качестве источника биологически активных веществ. Зерновки пшеницы, овса и ржи замачивали на 24 часа в водных растворах селенита натрия концентрации 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05%. Затем зерновки отмывали от раствора селенита натрия и проращивали на дистиллированной воде 7 дней. Контрольные зерновки пшеницы проращивали на дистиллированной воде. На 3 сутки определяли энергию прорастания, на 7 сутки – всхожесть, длину корней и проростков пшеницы. Проводили микроскопические срезы зерновок на 3 сутки с использованием микроскопа Микромед-1 и цифровой камеры Levenhuk M500 Base.

Для определения антирадикальной активности из проростков зерновых культур готовили экстракты. Для этого 1 г проростков растирали в ступке пестиком, заливая 70 % этиловым спиртом объемом 10 мл и настаивая 30 минут. Полученный экстракт центрифугировали 20 минут, супернатант использовали в дальнейшем исследовании.

Одним из методов определения антиоксидантного действия является обнаружение антирадикальной активности с участием стабильного свободного радикала N,N-дифенил-N'-пикрилгидразила (ДФПГ) $(C_6H_5)_2N-N\cdot-C_6H_2(NO_2)_{3-2,4,6}$. (Рис.1.).

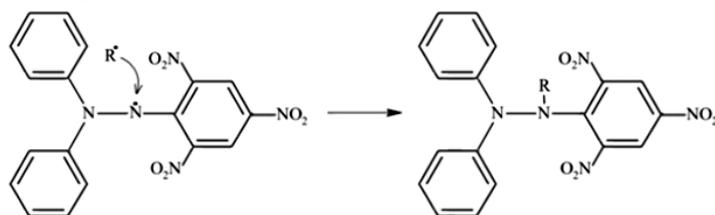


Рис.1. Схема взаимодействия радикалов R• с ДФПГ [8].

Антирадикальную активность экстрактов проростков зерновых культур определяли спектрофотометрически по кинетике восстановления стабильного радикала ДФПГ растительным экстрактом при длине волны 517 нм в течение 30 минут. В кювету добавляли в равном соотношении экстракт и раствор ДФПГ, в кювете сравнения находился раствор экстракта и 95% этанола, контролем являлся раствор ДФПГ [9]. Определение антирадикальной активности экстрактов производили по формуле:

% ингибирования ДФПГ $= (A_0 - A_x) \times 100\% / (A_0)$, где

A_0 – оптическая плотность ДФПГ в отсутствие растительного экстракта (контроль);

A_x – оптическая плотность исследуемого растительного экстракта с ДФПГ.

В результате исследований установлено, что раствор селенита натрия концентрации 0,05% оказывает ингибирующее действие на энергию прорастания и ростовые процессы проростков зерновых культур. При проведении микроскопического исследования в клетках зародыша семени обнаруживаются гранулы элементарного селена. Подобное явление встречается при обработке селеносодержащим препаратом зерновок кукурузы [10]. Низкие концентрации селенита натрия оказывают нейтральное действие на энергию прорастания зерновых культур и стимулирующее действие на ростовые процессы, увеличивая длину корней до 35 % и длину coleoptily проростков до 20 %. Проростки овса проявляют наибольшую чувствительность в ростовых процессах к воздействию селенита натрия.

При определении антирадикальной активности обнаружено, что 3-х и 7-ми суточные проростки зерновых культур обладают примерно равной антирадикальной активностью в узких пределах 70-80%. Используемые в эксперименте концентрации селенита натрия оказывают положительное действие на антирадикальную активность экстрактов 3-х суточных проростков зерновых культур (Рис.2).

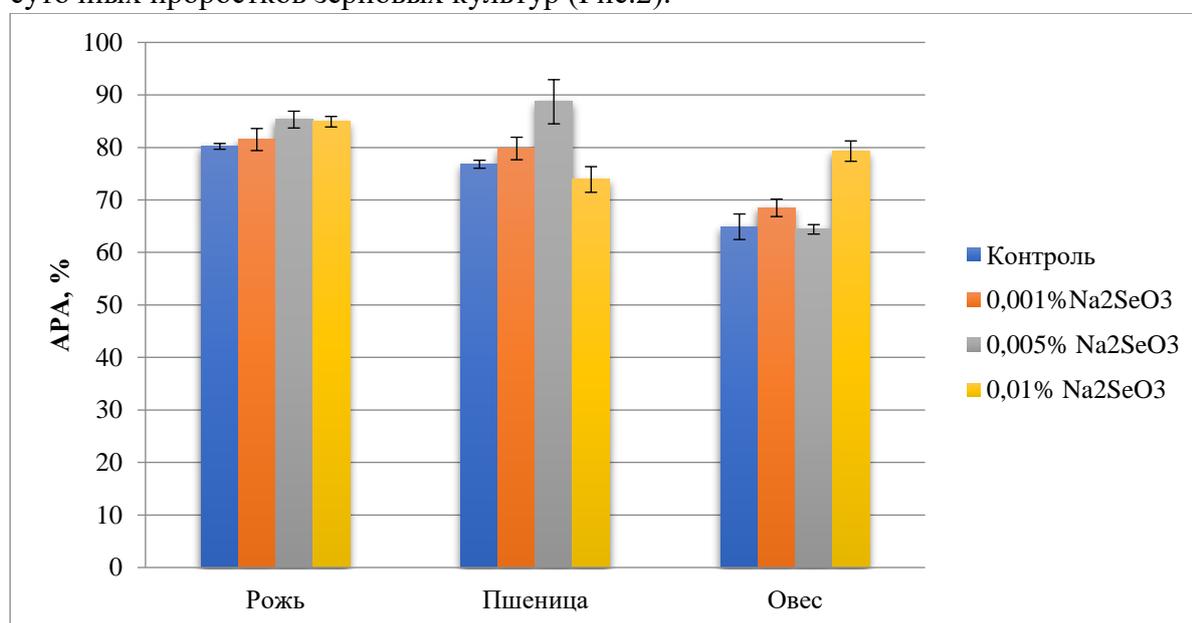


Рис.2. Антирадикальная активность 3-х суточных проростков зерновых культур, обогащенных селеном из растворов селенита натрия различной концентрации в течение 24 часов.

Проростки овса обладают сравнительно низкой антирадикальной активностью, проростки ржи преобладают в выраженности антирадикальной активности. Стимулирующее воздействие селена на антирадикальную активность выявлено на 14,4 % в проростках овса при использовании концентрации 0,01 % и на 11,9 % в проростках пшеницы при использовании концентрации 0,005 %.

Влияние селена на кинетику реакции поглощения ДФПГ исследуемых экстрактов селеносодержащих проростков зерновых культур выражается в замедлении скорости выхода на «плато» реакции в сравнении с контролем.

Таким образом, проростки зерновых культур обладают различной антирадикальной активностью и селен аккумулярующей способностью. Проростки овса наиболее чувствительны к воздействию селена и проявляют сравнительно слабые антирадикальные свойства. Обогащение низкими концентрациями селенита натрия проростков пшеницы и

ржи позволяют повысить их антирадикальную активность, что указывает на их перспективность в разработке функционально активных продуктов с содержанием селена.

Библиографический список

1. Mangiapane E., Pessione A., Pessione E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems // *Current Protein and Peptide Science*. - 2014. - V. 15. - № 6. - P. 598-607.
2. Barciela J., Herrero Latorre C., García-Martín S., Peña R.M. A brief study of the role of Selenium as antioxidant // *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. - 2008. - V. 7. - P. 3151-3155.
3. Amini S., Mahabadi V. Selenium nanoparticles role in organ systems functionality and disorder // *Nanomed Res J*. - 2018. - V. 3. - P. 117-124
4. Marton M., Mandoki Zs., Csapo-Kiss Zs., Csapo J. The role of sprouts in human nutrition. A review // *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*. - 2010. V. 3. P. 81–117.
5. Sangronis E., Machado C. J. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan* // *LWT*. - 2007. - V.40. - P. 116–120.
6. Li D., Wub K., Forbes Howie A., Beckett G. F., Wang W., Bao Y. Synergy between broccoli sprout extract and selenium in the upregulation of thioredoxin reductase in human hepatocytes // *Food Chemistry*. - 2008. - V. 110. - P. 193–198.
7. Yoshida M., Sano K., Ishiyuki E., Nishiyama T., Fukunaga K. Assessment of nutritional availability of selenium-enriched pumpkin // *Biomed Res Trace Elements*. - 2007. - V. 18. P. 391–394.
8. Панкратов А. Н., Цивилева О. М., Цымбал О. А. Выяснение возможности взаимодействия органических селенидов и соли дигидроселенохромилия с дифенилпикрилгидразилом // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. - 2019. - Т. 19 - Вып. 1. - С. 39-49
9. Тринеева О.В. Методы определения антиоксидантной активности объектов растительного и синтетического происхождения в фармации (обзор) // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. - 2017. - № 4. - С. 180–197.
10. Полубояринов П. А., Голубкина Н. А. Изучение биохимической функции селена и его влияние на содержание белковых фракций и активность пероксидазы в проростках кукурузы // *Физиология растений*. - 2015. - Т. 62. - № 3. - С. 396-403

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ГОРМОНОВ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА, В КОНЦЕНТРАЦИЯХ, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ БЕРЕМЕННОСТИ, В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ Т-ВЕТ И GATA-3 Т-ЛИМФОЦИТАМИ

Логинова О.А., Орлова Е.Г., Ширшев С.В.

ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

Ключевые слова: дифференцировка, пролиферация, CD4⁺ Т-лимфоциты, Th1, Th2

Формирование феномена иммунной толерантности при беременности представляет собой яркий пример гормон-зависимой перестройки иммунореактивности организма, которая сопровождается системным преобладанием гуморального иммунного ответа и повышенной генерацией клеток с супрессорной активностью [1-3]. Лептин и грелин – это метаболические гормоны, основная функция которых состоит в регуляции пищевого поведения и метаболизма, а также они обладают выраженной иммуномодулирующей

активностью [1] и играют важную роль на всех этапах гестации [4,5]. Ранее в наших работах было показано, что тимический этап дифференцировки лимфоцитов является потенциальной мишенью для гормональной регуляции при беременности [6-10], а лептин и грелин модулируют функциональную активность регуляторных и эффекторных популяций лимфоцитов периферической крови [11-15]. Целью данного исследования было изучение влияния лептина и грелина в концентрациях, характерных для беременности, в регуляции пролиферации и дифференцировки основных субпопуляций CD4⁺ Т-лимфоцитов – Т-хелперов 1 (Th1) и 2 типов (Th2) [16].

Материалы и методы.

Оценку роли лептина и грелина в регуляции экспрессии транскрипционных факторов T-bet (для Th1 клеток), GATA-3 (для Th2 клеток) и их пролиферативный потенциал (по экспрессии Ki-67) проводили в ходе их индукции из тимоцитов. В общей сложности в работе были использованы фрагменты 6 тимусов. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации, с изменениями 2013 г. и Конвенцией о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины, 1999 г. В работе использовали клеточные суспензии, получаемые из фрагментов тимусов, удаляемых в ходе хирургических операций при коррекции врожденных пороков сердца (ВПС) у детей до 1 года в ФГБУ «Федеральном центре сердечно-сосудистой хирургии им. С.Г. Суханова» Минздрава России, г. Пермь. Необходимо отметить, что тимэктомия является необходимым условием для обеспечения доступа в грудную полость для хирургической коррекции ВПС и соответствует общепринятой мировой и российской практике выполнения подобных операций. Обязательным критерием включения являлось наличие добровольного согласия со стороны законных представителей несовершеннолетних.

Тимоциты получали пипетированием из фрагментов органа, по необходимости удаляли эритроциты с использованием лизирующего буфера. Для инкубации использовали по 1×10^5 кл/мл в 100 мкл ППС (среда RPMI-1640, 10% ЭТС, 1 mM HEPES, 2 mM L-глутамин, пенициллина G (100 ЕД/мл)-стрептомицина (0,1 мг/мл) в 96-луночных полистироловых планшетах («Eppendorf», Германия) 72 ч при 37°C в условиях 5% CO₂. Гормоны использовали в концентрациях, отражающих их содержание в периферической крови при беременности. Грелин («Sigma», Израиль) вносили в концентрации 1,25 нг/мл, что сопоставимо с уровнем гормона в I–II триместрах беременности [5]. Лептин («Sigma», США) использовали в концентрации 35 нг/мл, которая соответствует содержанию в периферической крови во II–III триместрах беременности [4]. Инициацию процессов пролиферации и дифференцировки проводили с использованием CD3/CD28 частиц (Gibco™, «Life Technologies» AS, Норвегия), обеспечивающих активацию тимоцитов через T-клеточный рецептор с костимуляцией.

После инкубации определяли количество Th1 и Th2 методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Alexa Fluor® 700 anti-human CD4 (clone SK3, isotype mouse IgG1, κ), «BioLegend», США; PE/Cy7 anti-T-bet (clone 4B10, isotype Mouse IgG1, κ), «BioLegend», США; PE anti-GATA3 (clone 16E10A23, isotype mouse IgG2b, κ), «BioLegend», США; Brilliant Violet 421™ anti-human Ki-67 (clone Ki-67, isotype mouse IgG1, κ), «BioLegend», США) на проточном цитометре «CytoFlex S» («Beckman Coulter», США). Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции окна использовали соответствующие изотипические контроли. При окрашивании клеток использовали набор специализированных буферов для транскрипционных факторов (True-Nuclear™, «BioLegend», США). При анализе учитывали не менее 10000 событий.

Обработка данных цитофлюориметрии осуществлялась с использованием программы «CytExpert 2.0».

Стратегия гейтирования лимфоцитов включала логическое ограничение клеток по морфологии с использованием параметров прямого (FSC-A) и бокового светорассеивания (SSC-A), с исключением CD3/CD28 частиц (рис. 1А). Th1 определяли как процент CD4⁺ T-bet⁺ клеток в гейте лимфоцитов (рис. 1Б). Th2 определяли как процент CD4⁺ GATA-3⁺ клеток в гейте лимфоцитов (рис. 1Г). Пролиферативный потенциал Th1 и Th2 оценивали по экспрессии Ki-67 (рис. 1В и рис. 1Д, соответственно), белка присутствующего в ядрах делящихся клеток.

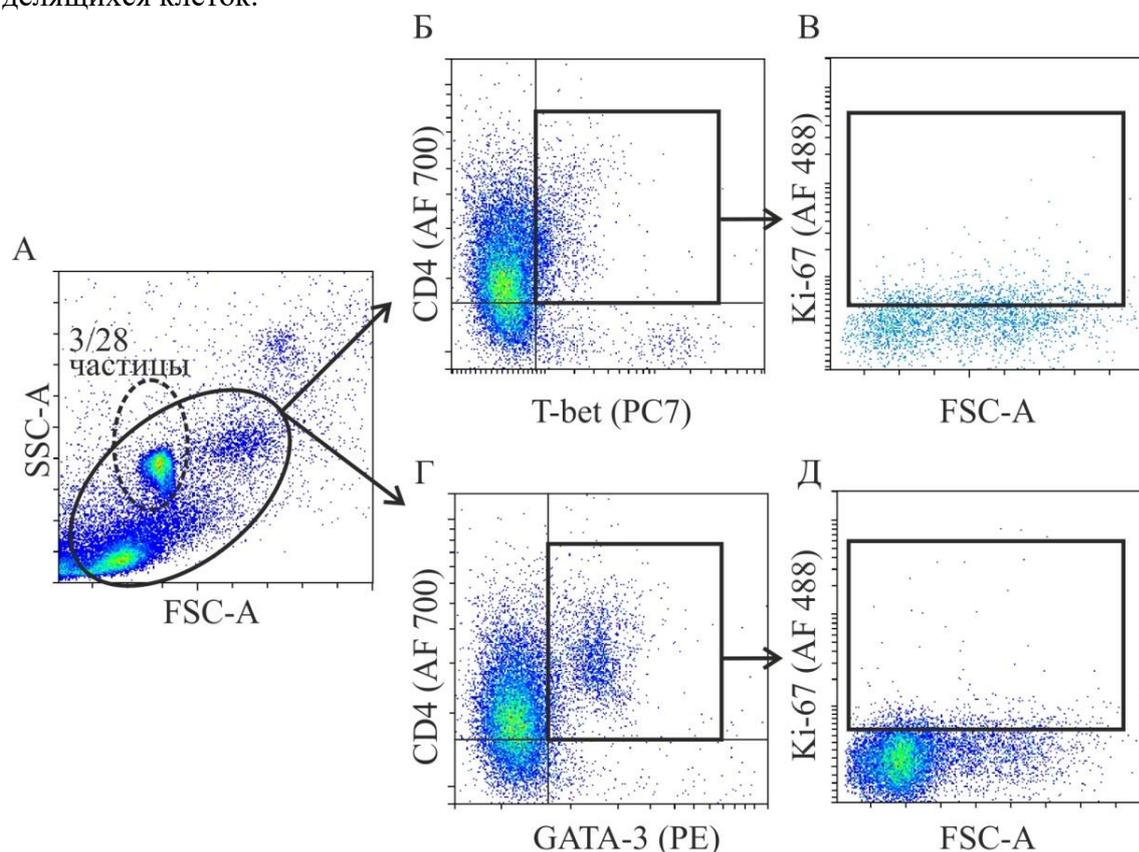


Рисунок 1. Стратегия гейтирования Th1 и Th2 лимфоцитов с использованием моноклональных антител методом проточной цитометрии

Статистический анализ.

При проверке нулевой гипотезы о нормальности распределения по методу χ -квадрат с использованием программы «STATISTICA 11.0» гипотеза о равенстве частот была отклонена, поэтому для выражения данных использовали медианы (Me), нижние (LQ) и верхние квартили (UQ), а достоверность различий между группами оценивали по критерию Вилкоксона для парных зависимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

CD4⁺ Т-лимфоциты играют важную роль в реализации клеточно-опосредованного и гуморального иммунитета. Дифференцировка Th1 клеток происходит при участии цитокинов IL-12 или IFN γ , активирующих передачу сигнала через STAT4 и STAT1, соответственно, экспрессию гена *TBX21*, активирующего специфический для Th1 транскрипционный фактор – T-bet [17-21]. Формирование Th1 сопровождается продукцией ряда провоспалительных цитокинов, преимущественно интерферона (IFN)- γ [17], который усиливает активность фагоцитирующих клеток и угнетает синтез IL-4, блокируя

дифференцировку наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов по Th2 пути [18, 22, 23]. Дифференцировка Th2 определяется экспрессией транскрипционного фактора GATA-3 (GATA binding protein 3), активируемого при участии STAT6 (индуцируемого IL-4) или STAT5 [19, 24] и сопровождается продукцией IL-4, IL-5, IL-6 и IL-13 [18], необходимых для заключительных этапов дифференцировки В-лимфоцитов [18, 21, 23, 25]. Однако, для субпопуляции эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов характерна определенная пластичность, определяемая действием эпигенетических факторов, в том числе гормонов.

При изучении эффектов лептина и грелина, в концентрациях соответствующих их содержанию в периферической крови при беременности, установлено, что грелин снижает пролиферативный потенциал как Th1, так и Th2, не влияя на их общее число (рис. 2), а лептин не оказывает статистически значимых эффектов.

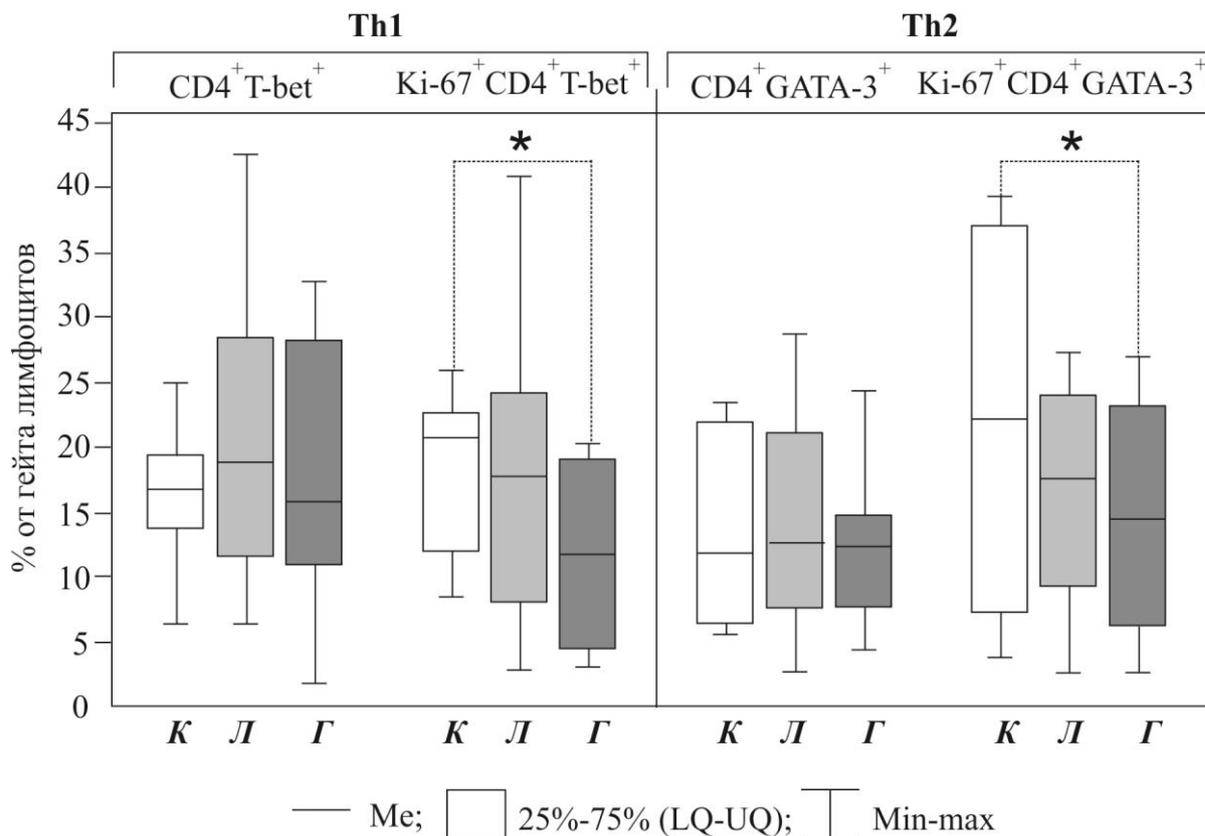


Рисунок 2. Эффекты лептина и грелина в регуляции числа Th1 и Th2 лимфоцитов, а также экспрессии Ki-67 в соответствующих субпопуляциях.

Примечание: К – контрольная проба; Л – лептин 35 нг/мл; Г – грелин 1,25 нг/мл; * – p < 0,05 по критерию Вилкоксона для парных зависимых выборок.

Результаты наших предшествующих исследований показали, что грелин, в концентрации характерной для беременности, может способствовать формированию центральной и периферической толерантности: усиливает дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), подавляет формирование интерлейкин (IL)-17-продуцирующих лимфоцитов (Th17), регулирует функциональную активности дендритных клеток тимуса [10, 12] и оказывает антипролиферативное действие в отношении тимоцитов [9], а настоящее исследование логично дополняет представление о грелине, как о важном факторе, способствующего угнетению иммунореактивности организма при беременности и позволяющего поддерживать системную толерантность иммунокомпетентных клеток

матери в отношении полуаллогенных антигенов плода, что, в конечном счете, определяет благоприятный исход беременности.

Работа выполнена в рамках НИОКТР АААА–А19–119112290007–7 «Механизмы регуляции иммунной системы».

Библиографический список

1. Tena-Sempere M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function // *Neuroendocrinology*. – 2007. – V.86. – P.229-241.
2. Ширшев, С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий / С.В. Ширшев // УрО РАН. – Екатеринбург. – 2009. – 582 с.
3. Zenclussen AC. Adaptive immune responses during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. – 2013. – V.69(4). – P.291-303.
4. Hardie L. and Trayhurn P. Circulating leptin in women: longitudinal study in menstrual cycle and during pregnancy // *Clin. Endocrinol*. – 1997. – V.47. – P.101 – 106.
5. Fuglsang J. et al. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy // *Clin. Endocrinol*. – 2005. – V.62. – P.554- 559.
6. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки ИЛ-17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // Доклады академии наук. 2014. Т.454. С.103–106.
7. Shirshov S.V. et al. Hormonal regulation of thymic-stage differentiation of IL-17-producing and T-regulatory lymphocytes // *Doklady Biological Sciences*. – 2014. – V.454, Is. 1. – P.65-68.
8. Shirshov S.V. et al. I.L. Hormonal regulation of dendritic cell differentiation in the thymus // *Bulletin of Experimental Biology and medicine*. – 2018. – V.165, N.2. – P.230-234.
9. Ширшев С.В. и др. Гормональная регуляция апоптоза и пролиферации тимоцитов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. № 3 (49). – С.49-50.
10. Орлова Е.Г. и др. Роль дендритных клеток тимуса в регуляции формирования Treg // Материалы II Международной научной конференции. – 2018. – С.251-253.
11. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Роль лептина и грелина в индукции дифференцировки ИЛ17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // БЭБИМ – 2013. -Т.156, №12.- 786-791.
12. Орлова Е.Г. и Ширшев С.В. Роль лептина и грелина в индукции дифференцировки ИЛ–17–продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.156. № 12. – С.786-790.
13. Орлова Е.Г. и др. Лептин и грелин регулируют созревание дендритных клеток, индуцирующих формирование регуляторных Т-лимфоцитов // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 462. № 6. – С. 723.
14. Ширшев С.В. и др. Роль лептина и грелина в регуляции фенотипа и продукции цитокинов НК-клетками периферической крови // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 470. №5. – С.603-606.
15. Орлова Е.Г. и др. Механизмы влияния лептина и грелина на созревание и функциональную активность дендритных клеток // Биохимия. – 2019. – Т. 84. № 1. – С.63-73.
16. Hubert P. et al. The cross-talk between dendritic and regulatory Tcells: good or evil? // *J. of Leukocyte Biol*. – 2007. – V. 82. – P.787-794.
17. Davidson N.J. et al. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice // *J. Exp Med*. – 1996. V.184. – P.41-51.

18. Mosmann T.R. and Coffman R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol.* – 1989. – V. 7. – P.145-173.
19. Schmitt E. et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma // *J. Immunol.* – 1994. – V. 153(9). – P.3989-3996.
20. Szabo S.J. et al. Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling // *Immunity.* – 1995. – Vol. 2(6). – P. 665-675.
21. Usui T. et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription // *J. Exp. Med.* – 2006. – V.203, №3. – P.755 -766.
22. Agnello D. et al. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights // *J. Clin. Immunol.* – 2003. – V. 23(3). – P. 147-161.
23. Coffman R.L. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective // *Nat. Immunol.* – 2006. – Vol. 7(6). – P. 539-541
24. Cousins D.J. et al. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines // *J Immunol.* – 2002. – V.169. – P.2498-2506
25. Mowen K.A. and Glimcher L.H. Signaling pathways in Th2 development // *Immunol. Rev.* – 2004. – V. 202. – P.203-222.

СКРИНИНГ УСТОЙЧИВЫХ К ТЕТРАХЛОРАУРОНОВОЙ КИСЛОТЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ РОДОКОККОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

Макарова М.В.¹, Куюкина М. С.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

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

Ключевые слова: родококки, тетрахлорауроносовая кислота, устойчивость, наночастицы золота.

Синтез наночастиц и наноматериалов представляет собой развивающуюся технологию, перспективную для многих отраслей, включая медицину и фармацевтическую промышленность. Наночастицы золота обычно получают физическими и химическими методами с использованием токсичных химикатов и радиоактивных веществ. Поэтому актуальна разработка новых эффективных и безопасных для окружающей среды микробиологических способов синтеза и сборки наночастиц [1, 2]. Актинобактерии рода *Rhodococcus* обладают высокой углеводородокисляющей активностью, способны к аккумуляции ионов тяжелых металлов и синтезу нетоксичных биосурфактантов с выраженной нефтеотмывающей и эмульгирующей способностью [3]. В литературе имеются сведения о взаимодействии актинобактерий рода *Rhodococcus* с водными ионами AuCl⁴⁻, что приводит к восстановлению ионов металла и формированию в клетках родококков монодисперсных наночастиц золота [4]. Однако токсическое воздействие тетрахлорауроносовой кислоты (ТХАК) препятствует эффективному синтезу наночастиц поскольку ионы металла значительно более токсичны, чем металлические наночастицы

размерного диапазона 10-100 нм [5]. Поэтому актуален поиск бактериальных штаммов, устойчивых к высокой концентрации ТХАК.

Цель исследования – изучение устойчивости родококков к воздействию ТХАК и отбор перспективных штаммов для синтеза наночастиц золота.

В работе использовали культуры *R. erythropolis* ИЭГМ 766, *R. fascians* ИЭГМ 525, ИЭГМ 1218, *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162, *R. ruber* ИЭГМ 1135, ИЭГМ 1217 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ; WDCM #768; <http://iegmcol.ru/>). Бактерии, выращенные в среде LB, отмывали дистиллированной водой и ресуспендировали в воде до значения оптической плотности (OP_{600}), равной 1,5-2,2. Методом двукратных серийных разведений готовили концентрации тетрахлорауроной кислоты ($HAuCl_4$) от 32 до 1000 мг/л. Эксперименты проводили в 96-луночных микропланшетах, которые после инокулирования непрерывно перемешивали (300 об/мин) на микропланшетном шейкере (Heidolph, Германия) в течение суток при комнатной температуре. Жизнеспособность родококков определяли путем окрашивания 0,2%-ным раствором йодонитротетразолия хлорида (ИНТ) (“Sigma”, США) по появлению характерного пурпурного осадка формаза, формирующегося в присутствии активно респираторных клеток. Количество образовавшихся наночастиц золота и численность жизнеспособных бактериальных клеток определяли по изменению ОП суспензий на микропланшетном ридере (Multiskan Ascent, Thermo, Финляндия) при длине волны 630 нм. Появление ярко-фиолетового окрашивания свидетельствовало об образовании наночастиц Au вследствие поглощения излучения в видимой области электромагнитного спектра из-за возбуждения поверхностных плазмонных колебаний, придающих наночастицам золота яркие цвета в различных средах [4]. Морфологию клеток изучали с помощью светового микроскопа «Axiostar plus» Carl Zeiss (Германия) с использованием фазового контраста.

По нашим данным (рис. 1), при низких (32-125 мг/л) концентрациях ТХАК жизнеспособность клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 766 и *R. ruber* ИЭГМ 1135 была сопоставима с данными биотического контроля, тогда как повышение концентрации кислоты вплоть до 500 мг/л приводило к резкому росту показателя OP_{630} окрашенной ИНТ клеточной суспензии, свидетельствуя о почти двукратном повышении респираторной активности родококков. При максимальной (1 г/л) концентрации ТХАК наблюдалось лишь незначительное (на 5%) снижение жизнеспособности клеток. Таким образом, исследованные штаммы родококков проявляли более высокую устойчивость к действию ТХАК по сравнению с другими микроорганизмами [5].

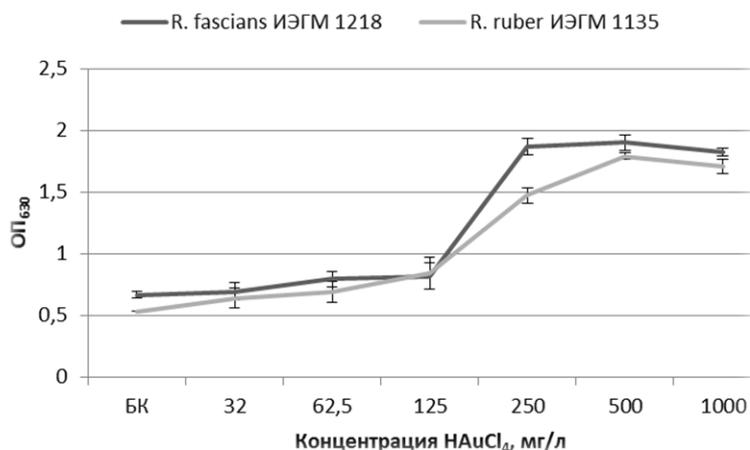


Рис. 1. Жизнеспособность клеток *Rhodococcus* spp. в присутствии различных концентраций ТХАК.

Обнаружено, что клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 766 при добавлении в среду 32 мг/л ТХАК агрегировали с образованием крупных (100-200 мкм) агломератов, а для *R. ruber* ИЭГМ 1135 было характерно образование меньших по размеру агрегатов и наличие одиночных клеток (рис. 2).

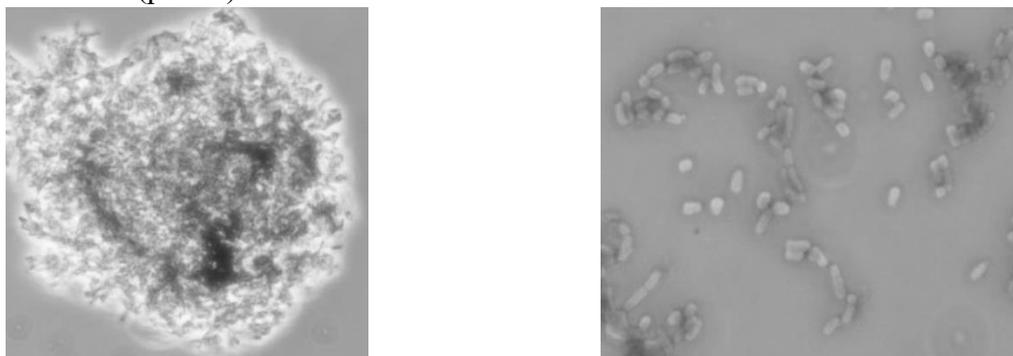


Рис. 2. Клетки *R. erythropolis* ИЭГМ 766 (слева) и *R. ruber* ИЭГМ 1135 (справа) в присутствии HAuCl_4 , ув. $\times 1000$.

Далее была изучена способность отобранных культур родококков к синтезу наночастиц золота при повышенных (62,5-1000 мг/л) концентрациях ТХАК. Как видно на рис. 3, максимальный синтез наночастиц золота в клетках *R. erythropolis* ИЭГМ 766, *R. fascians* ИЭГМ 525 и *R. ruber* ИЭГМ 1217 наблюдался при концентрации HAuCl_4 , достигающей 500 мг/л, тогда как клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 1162 активно синтезировали наночастицы золота уже в присутствии 250 мг/л ТХАК.

Таким образом, для синтеза и выделения наночастиц золота отобраны штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 766 и *R. ruber* ИЭГМ 1135, для которых характерны наиболее высокая выживаемость и различные механизмы устойчивости при повышенной концентрации ТХАК.

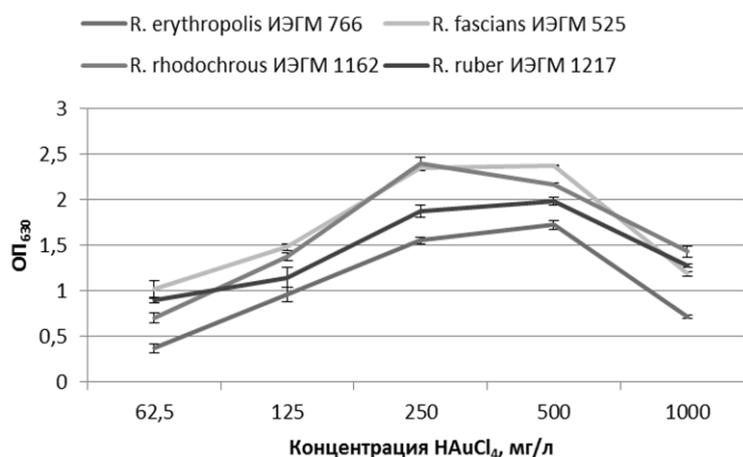


Рис. 3. Синтез наночастиц золота клетками родококков в присутствии различных концентраций ТХАК.

Исследования выполнены в рамках госзаданий Минобрнауки РФ (AAAA-A19-119112290010-7 и FSNF-2020-0008) и поддержаны грантом РФФ 18-14-00140.

Библиографический список

1. Ganesh Babu M.M., Gunasekaran P. Production and structural characterization of crystalline silver nanoparticles from *Bacillus cereus* isolate // Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces. 2009. V. 74. P. 191-195.

2. Camas M., Çelik F., Camas A., Ozalp H. Biosynthesis of gold nanoparticles using marine bacteria and Box–Behnken design optimization. // *Particulate Science and Technology*. – 2018. V. 37. P. 1-8.

3. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Application bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* // In: *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs / Ed. A. Steinbüchel. Springer. 2019. V. 16. P. 231-270.

4. Ahmad A. *et al.* Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species. // *Nanotechnology*. 2003. V. 14. P. 824–828.

5. Чумаков Д. С., Голубев А. А., Коннова С. А., Дыкман Л. А., Богатырев В. А. Оценка цитотоксичности ионного и коллоидного золота для микроводоросли *Dunaliella Sauna* в микропланшетной тест-системе. // *Изв. Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология*. 2017. №17. С. 305-311.

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА *BETULA PUBESCENS* EHRL. В ПЕРМСКОМ КРАЕ Мальшкіна Е.Е.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Научный руководитель: д-р биол. наук, проф. Боронникова С. В.

Ключевые слова: *Betula pubescens* Ehrh., эффективные праймеры.

Изучение сохранения и воспроизводство генетического разнообразия лесобразующих и хозяйственно-ценных пород является одним из центральных направлений лесной генетики [1]. Урал является одним из центров видообразования рода *Betula*. Виды этого рода в лесных системах являются почвоукрепляющими и огнестойкими растениями, а в хороших условиях продуцируют высокоценные лесоматериалы – фанерный, лыжный, ружейный кряж [2].

Betula pubescens Ehrh. (*Betulaceae*) является ценным объектом для исследования процессов интрогрессивной естественной гибридизации, авто- и аллоплоидизации видов рода *Betula*. Особенно актуальны вопросы видообразования и филогенетических взаимоотношений видов и *Betula pendula* Roth. и *B. pubescens* [3]. Генетическое разнообразие у березы повислой изучено в большей степени, чем у березы пушистой. Это связано с тем, что *B. pubescens* имеет тетраплоидный набор хромосом, что затрудняет изучение полиморфизма и секвенирование генома. Определение полиморфизма ISSR-PCR маркеров у березы пушистой на Урале ранее не проводилось. Цель исследования – выявление эффективных ISSR-праймеров для выявления генетического разнообразия популяций березы пушистой на Урале.

Объектами исследований являлись три популяции *B. pubescens*, расположенных в Пермском крае: первая популяция на территории Учебно-научной базы университета «Предуралье» (PRED), вторая популяция – в государственном природном заповеднике «Басеги» (BSG), а третья популяция – в Полазненском лесничестве Добрянского района (POL). Фрагменты листьев были собраны в 2020 году у 77 растений из трех популяций.

Выделение ДНК проводили по методике С. Роджерса [4] с небольшими модификациями, то есть в качестве сорбента использовали PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). Навеска растительного материала составляла 20 мг. Концентрацию и качество ДНК определяли на приборе Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 («Thermo scientific», USA) и

выравнивали в пределах 10 нг/мкл. Отбор эффективных ISSR-праймеров осуществлялся по выявлению наибольшего числа фрагментов, включая и полиморфные, на ISSR-спектре и воспроизводимости результатов ПЦР. Эффективность ISSR-праймеров рассчитывалась в соответствии со шкалой 1–5: от низкой (1) до высокой [5]. Для полимеразной цепной реакции реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 2 единицы Таг-полимеразы («Силекс М», Россия); 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР («Силекс М», Россия); 25 пМ праймера («Евроген», Россия); 2,5 mM MgCl₂ («Силекс М», Россия); 0,25 mM dNTP («Fermentas», Литва); 5 мкл тотальной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере MJ Mini-Cycler («Bio-Rad», USA) по следующей программе: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 сек.; температура отжига, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; температура отжига, 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин. при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 56 до 64°C для ISSR-праймеров. В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозном геле в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1.2 + 1.5 + 2 + 3 Kb DNA Ladder); «ООО-СибЭнзим-М», Москва), определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One («Bio-Rad», USA). Для проверки достоверности полученных спектров ДНК опыт повторяли не менее трех раз.

Таблица 1

Эффективность ISSR-праймеров для анализа ДНК *B. pubescens*

Праймер		T _m ,C	Эффективность	Праймер		T _m ,C	Эффективность
M1	(AC) ₈ CG	56	2	ISSR-5	(AG) ₈ CA	56	5
M2	(AC) ₈ CC	56	2	ISSR-6	(AG) ₈ CG	56	3
M3	(AC) ₈ CT	54	5	ISSR-7	(CTC) ₆ C	56	2
M27	(GA) ₈ C	52	3	ISSR-8	(GAG) ₆ C	56	4
X1	(CA) ₆ G	61	2	ISSR-9	(ACG) ₇ G	56	4
X9	(ACC) ₆ G	62	1	ISSR-10	(ATG) ₇ C	56	5
X10	(AGC) ₆ C	64	5	CR-212	(CT) ₈ TG	56	2
X11	(AGC) ₆ G	64	4	CR-215	(CA) ₆ GT	56	4
ISSR-1	(AC) ₈ T	56	2	CR-216	(GA) ₆ GG	56	3
ISSR-3	(TG) ₈ AA	56	4	CR-217	(GT) ₆ GG	56	3
ISSR-4	(TG) ₈ GC	56	5	CR-218	(GA) ₆ CC	56	4

Примечание: эффективность праймеров от 1 (низкая) до 5 (высокая) определена по шкале, предложенной С.В. Боронниковой и Р.Н. Календарем [5]; полужирным шрифтом выделены эффективные ISSR-праймеры, T_m - температура отжига

Для определения эффективности были выбраны 22 ISSR-праймера с ди- и три-нуклеотидными мотивами и с одним или двумя нуклеотидами в качестве якорей. Длина анализируемых праймеров варьировала от 13 (X1) до 22 (ISSR-9) нуклеотидов. С тотальной ДНК *B. pubescens* в ПЦР был проанализирован каждый ISSR-праймер. Число ампликонов в зависимости от праймера варьировалось от 3 ((CA)₆G, (AC)₈CG, (CT)₈TG) до 15 ((TG)₈AA, (AGC)₆C, (AGC)₆G). Из проанализированных ISSR-праймеров с тотальной ДНК березы пушистой 5 показали высокую эффективность, так как с ними было получено наибольшее число фрагментов с высоким полиморфизмом, соответствующую баллу 5: (M3 ((AC)₈CT),

X10 ((AGC)₆C), ISSR-4 (TG)₈GC, ISSR-5 ((AG)₈CA), ISSR-10 ((ATG)₇C)). Шесть ISSR-праймеров обнаружили среднюю эффективность, обозначенную баллом 4: (X11 ((AGC)₆G), ISSR-3 ((TG)₈AA), ISSR-8 ((GAG)₆C), ISSR-9 ((ACG)₇C), CR-215 ((CA)₆GT), CR-218 ((GA)₆CC)). У остальных одиннадцати праймеров эффективность низкая, соответствующая баллам 3 и ниже (таблица 1).

Таким образом, для проведения дальнейших молекулярно-генетических исследований полиморфизма ДНК *B. pubescens* были выявлены пять эффективных ISSR-праймеров, из которых 3 динуклеотидных (AC)₈CG, (TG)₈GC, (AG)₈CA, и два тринуклеотидных (AGC)₆C и (ATG)₇C. Отобранные эффективные праймеры позволят выявить и оценить генетическое разнообразие популяций березы пушистой в Пермском крае.

Библиографический список

1. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
2. Лесной план Пермского края.
3. Гроздова Н.Б. Береза. М.: Лесная промышленность, 1979. 81 с.
4. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Molecular Biology. 1985. Vol. 1, № 19. P. 69–76.
5. Календарь Р.Н., Боронникова С.В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Материалы 4 Моск. междунар. конгресса. М.: Изд-во РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. Ч. 2. С. 121.

РОЛЬ ФОТОПЕРИОДА В ПРОДУКЦИИ МЕЛАТОНИНА И РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ КОНТИНЕНТАЛЬНОГО КЛИМАТА

Мальцева А.Е.

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Ключевые слова: сезонность, репродуктивная функция, фотопериод, континентальный климат, мелатонин.

Репродуктивная функция включает в себя цепь морфофизиологических и психофизиологических процессов и разнообразных форм поведения, направленных на обеспечение рождения и выхаживания потомства.

Активность мужской репродуктивной функции является непрерывной и не имеет циклических проявлений, как в женском организме.

Принципиальной особенностью функциональной активности женской репродуктивной функции является ежемесячная цикличность секреции гонадотропинов, выработка которых, в свою очередь, контролируется центральными железами эндокринной системы и в большей степени эпифизом.

У человека эпифиз достигает максимального развития к 5-6 годам жизни, после чего, несмотря на продолжающееся функционирование, начинается его возрастная инволюция. К 10–15 годам жизни в них появляется пигмент (липохром) и к периоду полового созревания размеры эпифиза обычно уменьшаются.

Главный гормон эпифиза - мелатонин – гормон фотопериодичности, выделяется преимущественно ночью, т.к. его выделение угнетается импульсами, поступающими из сетчатки глаза.

Так, в 1998 году I. Provencio обнаружил в сетчатке человека пигмент меланопсин. Он был найден только в небольшом числе ганглиарных клеток, воспринимающих световой сигнал из сетчатки. Этот зрительный пигмент не принимает непосредственного участия в зрительном процессе, но является одним из элементов, обеспечивающих реализацию циркадного ритма «сон-бодрствование» и супрессию эпифизального мелатонина [1].

Информацию о внешней освещенности эпифиз получает по сложно устроенному нервному пути, узловую, переключающую роль в котором играют супрахиазматические (СХЯ) ядра гипоталамуса, являющиеся водителем циркадианного биологического ритма. Зрительная информация от сетчатки через ответвление зрительного нерва попадает в СХЯ, находящиеся в глубине полушарий над зрительным перекрестом. Затем эти сигналы нисходят через гипоталамус по проводящим путям вдоль ствола головного мозга в шейный отдел спинного мозга, откуда по симпатическим нервам через отверстия в черепе проникают обратно в головной мозг и, наконец, достигают эпифиза. Ночью, в темноте, когда большинство нейронов СХЯ бездействует, эти нервные окончания выделяют норадреналин, активирующий в пинеалоцитах синтез ферментов, образующих мелатонин [2].

Мелатонин синтезируется пинеалоцитами из серотонина и угнетает секрецию гонадолиберина гипоталамусом и гонадотропинов передней доли гипофиза.

Яркий свет мгновенно блокирует синтез мелатонина, в то время как в постоянной темноте суточный ритм выброса, поддерживаемый периодической активностью СХЯ, сохраняется. Поэтому его максимальный уровень в эпифизе и крови человека наблюдается в ночные часы, а минимальный – в утренние и дневные.

Таким образом, концентрация гормона в крови снижается в условиях длинного дня, что, в результате понижает его угнетающее влияние на выделение гонадотропинов и половых стероидов, что приводит к активации репродуктивной функции в весеннее время, увеличению частоты зачатий, а затем и родов.

Уровень мелатонина в крови у человека в условиях континентального климата минимален в период с апреля по июль, то есть, в период максимальной продолжительности светового дня и освещенности. В мае также максимального значения достигает амплитуда между минимальным (дневным) и максимальным (ночным) уровнями мелатонина в течение суток [3].

Длительность ночного подъема уровня мелатонина больше в зимний период, чем летом, что является сигналом для снижения активности гипоталамического генератора секреции гонадотропин-релизинг гормона (GnRH). Эти изменения приводят к снижению способности к зачатию в зимние месяцы [4].

В качестве практической части исследования, нами анализировались данные о количестве рожденных младенцев обоего пола в одном из роддомов города Барнаула Алтайского края за период 2014 года. Величина выборки составила 2387 рождений.

При анализе исследуемого материала рассматривалась годовая динамика количества родов по данным среднемесячных значений (рис. 1).

На основании полученных данных по Алтайскому краю можно заключить, что в 2014 г. наблюдается общая тенденция снижения количества родов в диапазоне от января до декабря.

Максимум рождений приходится на январь, а минимум – на октябрь, что, соответственно, означает, что максимум зачатий отмечается в апреле-мае, а минимум – в

феврале, что подтверждает ранее проанализированный теоретический обзор. Эти результаты в целом согласуются и с данными других авторов, полученными в умеренных широтах Северного полушария [5].

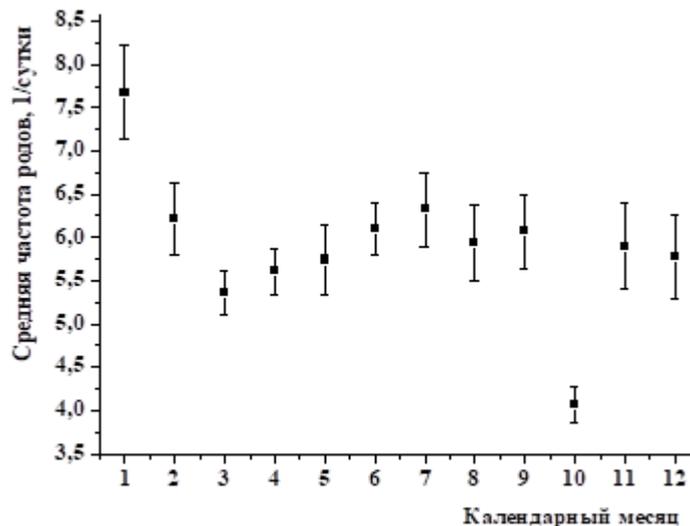


Рисунок 1. Среднемесячные значения количества родов в 2014 г.

Январский всплеск числа родов можно объяснить следующим: многолетняя разность среднемесячных температур воздуха между мартом и маем в Сибирском регионе превышает магнитуду годового ритма температуры воздуха в Западной Европе. Таким образом, апрель является месяцем резкого потепления в Сибири после мартовского схода снега, таяние которого требует очень много энергии расположенного уже высоко над горизонтом Солнца и охлаждает приземный воздух. Такое резкое возрастание температуры весной стимулирует гормональные перестройки в организме, что сопровождается увеличением в это время частоты половых контактов и зачатий. Продукция мелатонина также напрямую связана с температурой среды [2].

В заключении можно сказать, что одним из основных регуляторов репродуктивной функции человека является мелатонин, выработка которого зависит от фотопериода, то есть продолжительности светового дня.

По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

1. В условиях континентального климата общая тенденция снижения количества родов наблюдается в диапазоне от января до декабря;
2. Максимум рождений приходится на январь, а минимум – на октябрь, что, соответственно, означает, что максимум зачатий отмечается в апреле-мае, а минимум – в феврале, так как апрель является месяцем резкого потепления в Сибири, а это стимулирует гормональные перестройки в организме, что сопровождается увеличением в это время частоты половых контактов и зачатий;

Библиографический список

1. Provencio I, Jiang G, De Grip W, Hayes W, Rollag M (1998). "Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye" (HTML: full text). Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1): 340–5. doi:10.1073/pnas.95.1.340. PMID 9419377.

2. Анисимов В.Н., Виноградова И.А. Старение женской репродуктивной системы и мелатонин. – СПб.: Издательство «Система», 2008. - 44 с.

3. Bartsch C, Bartsch H, Karasek M. Melatonin in clinical oncology // Neuroendocrinology letters.- 2002; 23 (suppl. 1).- P. 30-38.

4. Коваленко Р.И. Эпифиз в системе нейроэндокринной регуляции // В кн.: Основы нейроэндокринологии / Под ред. В.Г. Шаляпиной и П. Д.Шабанова. СПб.: Элби-СПб, 2005.- С.337-365.

5. Мальцева А.Е. Анализ сезонного воздействия абиотических факторов среды в условиях континентального климата на репродуктивную функцию человека и морфофункциональное состояние новорожденных / А.Е. Мальцева // Проблемы региональной экологии.- Москва, изд-во Камертон, № 5, 2019 г., 129 с.

ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ И АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОСТРУЮ СТАДИЮ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Марченко Д.М.¹, Сайдакова Е.В.^{1,2}, Королевская Л.Б.², Шмагель К.В.²

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

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

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, острая стадия, хроническая стадия, лейкоцитарная формула, абсолютное количество лейкоцитов

Острая стадия ВИЧ-инфекции – период продолжительностью от нескольких недель до полугода после момента заражения. Он характеризуется неспецифичными и переменными симптомами (лихорадка, лимфаденопатия, сыпь и т.д.) и отсутствием детектируемых антител [1]. Как и другие инфекционные заболевания, ВИЧ-инфекция может вносить изменения в пул лейкоцитов периферической крови зараженных. **Целью** настоящей работы был анализ показателей лейкоцитарной формулы и абсолютного количества лейкоцитов периферической крови в острую стадию ВИЧ-инфекции.

План работы был одобрен этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № комитета IRB00008964). От каждого участника исследования было получено письменное информированное согласие. Обследовано две группы больных: пациенты с острой ВИЧ-инфекцией (ОВИ; n=28) и субъекты с хронической ВИЧ-инфекцией (ХВИ; n=25). В контрольную группу (К) вошло 26 относительно здоровых добровольцев без ВИЧ-инфекции. В группу ОВИ были включены пациенты Пермской краевой клинической инфекционной больницы, ранее госпитализированные с лихорадкой неясного генеза. Присутствие ВИЧ в их крови подтверждали методом полимеразной цепной реакции. В группу ХВИ вошли пациенты Пермского центра СПИД. Эти больные были привержены антиретровирусной терапии (АРТ) более двух лет, вирусная нагрузка ВИЧ в их крови была подавлена ниже порога детекции тест-систем (менее 50 копий/мл), а число CD4⁺ Т-клеток эффективно увеличилось на фоне лечения.

Периферическую кровь забирали из кубитальной вены в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Количество лейкоцитов определяли в камере Горяева общепринятым методом [2]. Относительную численность отдельных популяций клеток подсчитывали в мазках крови, окрашенных по методу Романовского-Гимзе. Определение относительного количества периферических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с

использованием набора моноклональных антител Immunocytometry Systems (BDIS) Simultest™ (Becton Dickinson, США), рассчитывали абсолютные количества клеток.

Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (25-75 перцентиль). Статистическая значимость различий между группами установлена на основе U-критерия Манна-Уитни.

В группу ОВИ вошли преимущественно мужчины (57%). Средний возраст больных составил 34 года. Группа ХВИ была преимущественно представлена женщинами (56%). Средний возраст пациентов также составил 34 года. Представителями контрольной группы были в основном мужчины (58%). Средний возраст субъектов этой группы составил 32 года. Три группы обследованных не имели статистически значимых отличий по возрасту и полу ($P > 0,05$).

Абсолютное число лейкоцитов в крови пациентов группы ОВИ было сопоставимо с соответствующими показателями ХВИ и К ($P > 0,05$; табл.1). У ВИЧ-позитивных пациентов, находящихся в острой фазе заболевания, в отличие от здоровых людей были установлены признаки нейтропении и моноцитопении (относительной и абсолютной). В группе ХВИ была отмечена абсолютная нейтропения, обусловившая снижение общего количества лейкоцитов по отношению к здоровой группе.

Таблица 1

Абсолютное и относительное количество лейкоцитов в крови ВИЧ-инфицированных и здоровых людей

Показатели	Группы пациентов		
	ОВИ	ХВИ	К
	n = 28 (1 группа)	n = 25 (2 группа)	n = 26 (3 группа)
Лейкоциты (*10 ⁶ клеток/мл)	6,08* (4,00-7,59)	5,50 (4,95-6,60) $p_{2-3} < 0,05$	6,35 (5,28-8,23)
Нейтрофилы (*10 ⁶ клеток/мл)	2,63 (1,49-3,88) $p_{1-3} < 0,01$	3,22 (2,40-3,63) $p_{2-3} < 0,05$	3,79 (2,92-4,76)
Нейтрофилы (%)	43,5 (38,8-56,0) $p_{1-3} < 0,01$	56,0 (52,0-59,0)	57,0 (54,0-63,0)
Моноциты (*10 ⁶ клеток/мл)	0,12 (0,06-0,19) $p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$	0,33 (0,24-0,45)	0,33 (0,26-0,57)
Моноциты (%)	2,0 (1,0-3,3) $p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$	5,0 (4,0-7,0)	6,0 (4,0-7,8)
Лимфоциты (*10 ⁶ клеток/мл)	2,70 (2,10-3,36) $p_{1-2} < 0,01$	1,98 (1,71-2,46)	2,16 (1,70-2,88)
Лимфоциты (%)	49,0 (40,5-57,5) $p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,01$	36,0 (31,0-42,0)	35,0 (28,0-38,8)

Примечание: * – указаны медианы значений и их интерквартильные размахи. ОВИ – острая ВИЧ-инфекция; ХВИ – хроническая ВИЧ-инфекция; К – контроль. Различия между группами установлены на основе U-критерия Манна-Уитни.

Известно, что воздействуя на костный мозг, ВИЧ может подавлять миелопоэз и снижать темпы выхода зрелых клеток в кровотоки [3]. Уменьшение числа нейтрофилов и моноцитов в крови группы ОВИ может свидетельствовать о том, что эти негативные эффекты ВИЧ-инфекции проявляются уже на ранней стадии заболевания. Следует отметить, что в мазках крови больных группы ОВИ также была выявлена тенденция к увеличению количества незрелых и патологических форм лейкоцитов (данные не представлены).

В группе ОВИ выявлены признаки лимфоцитоза. В сравнении с соответствующими показателями ХВИ лимфоцитоз ОВИ был и относительным, и абсолютным; в сравнении с К – только относительным. Кроме того, по сравнению с нормой в острую стадию ВИЧ-инфекции изменился количественный состав некоторых субпопуляций Т-лимфоцитов: снизилось относительное и абсолютное содержание CD4⁺ Т-клеток; увеличились доля и число CD8⁺ Т-клеток (табл.2). Примечательно, что численность CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов не отличалась в двух группах ВИЧ-позитивных больных. Также было отмечено, что характерное для пациентов группы К соотношение CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток (1,6 для относительных показателей; 1,7 – для абсолютных) было обратно пропорциональным у всех ВИЧ-позитивных пациентов (0,6 для относительных и абсолютных показателей). Рост количества CD8⁺ Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных субъектов свидетельствует о развитии противовирусного иммунного ответа [4]. Следовательно, ответ цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, направленный на уничтожение пораженных вирусом CD4⁺ Т-клеток, развивается уже в острую стадию заболевания. Полученные результаты подтверждают существующие данные [5]: при первичной инфекции CD8⁺ Т-лимфоциты, специфичные к вирусным белкам Env, Gag, Pol, Nef и Tat, активно участвуют в контроле репликации ВИЧ.

Таблица 2

Абсолютное и относительное количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в крови ВИЧ-инфицированных и здоровых людей

Показатели	Группы пациентов		
	ОВИ	ХВИ	К
	n = 28 (1 группа)	n = 25 (2 группа)	n = 26 (3 группа)
CD4 ⁺ Т-клетки (*10 ⁶ клеток/мл)	0,51* (0,24-0,85) p ₁₋₃ <0,01	0,53 (0,42-0,60) p ₂₋₃ <0,01	0,94 (0,73-1,26)
CD4 ⁺ Т-клетки (%)	26,3* (20,9-33,7) p ₁₋₃ <0,01	27,1 (22,5-33,2) p ₂₋₃ <0,01	44,4 (38,9-51,6)
CD8 ⁺ Т-клетки (*10 ⁶ клеток/мл)	0,81 (0,45-1,26) p ₁₋₃ <0,05	0,78 (0,64-0,98) p ₂₋₃ <0,01	0,56 (0,47-0,72)
CD8 ⁺ Т-клетки (%)	42,6 (33,8-53,2) p ₁₋₃ <0,01	41,5 (35,6-54,4) p ₂₋₃ <0,01	27,9 (22,2-33,0)

Примечание: * – указаны медианы значений и их интерквартильные размахи. ОВИ – острая ВИЧ-инфекция; ХВИ – хроническая ВИЧ-инфекция; К – контроль. Различия между группами установлены на основе U-критерия Манна-Уитни.

Таким образом, по сравнению со здоровыми людьми у ВИЧ-позитивных больных в острую стадию инфекции изменяются относительная и абсолютная численность отдельных

популяций иммунных клеток: развиваются нейтропения, моноцитопения и лимфоцитоз; снижается количество CD4⁺ Т-клеток и увеличивается число CD8⁺ Т-лимфоцитов. Также показатели крови в острой стадии заболевания отличаются от таковых в контролируемой посредством АРТ хронической стадии ВИЧ-инфекции, при которой количество моноцитов и лимфоцитов восстанавливается до нормальных значений.

Библиографический список

1. Dybul M., Fauci A.S., Bartlett J.G., Kaplan J.E., Pau A.K. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents // *Annals of internal medicine*. – 2002. – V. 137. – № 5. – P. 381–433.
2. Зупанец И.А., Мисюрева С.В., Прописнова В.В., Попов С.Б., Сахарова Т.С., Бездетко Н.В., Залюбовская О.И., Леонтьева Ф.С., Туляков В.А. Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования: учеб. пособие. – 3-е изд., перераб. и доп. – Харьков: НФаУ: Золотые страницы, 2005. – С. 25-26.
3. Durandt C., Potgieter J.C., Mellet J., Herd C., Khoosal R., Nel J.G., Rossouw T., Pepper M.S. HIV and Haematopoiesis // *South African Medical Journal*. – 2019. – V. 109. – № 8b. – P. 40-45.
4. Zinkernage R.M., Althage A. Antiviral Protection by Virus-Immune Cytotoxic T Cells: Infected Target Cells Are Lysed Before Infectious Virus Progeny Is Assembled // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1977. – V. 145. – № 3. – P. 644-651.
5. Borrow P., Lewicki H., Hahn B.H., Shaw G.M., Oldstone M.B. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection // *Journal of virology*. – 1994. – V. 68. – № 9. – P. 6103-6110.

ДЕЙСТВИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ СМЕШАННОЙ БИОПЛЕНКИ *ESCHERICHIA COLI* И *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* НА ФОНЕ ПОВЫШЕННОГО ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ

Масленникова И.Л.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН-филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: *E. coli*, *S. epidermidis*, биопленки, антибиотики, антисептики, бактериофаг

Образование биопленок - важный механизм вирулентности многих бактериальных патогенов, к числу которых относятся и комменсальные бактерии *Escherichia coli* K12 и *Staphylococcus epidermidis* при нахождении их в атипичных биотопах. Так, оба вида встречаются на биотических (трофические язвы, ожоговые и хирургические раны) и абиотических поверхностях (катетеры, импланты) [1, 2, 3, 4].

Биопленка может быть представлена моновидовым или смешанным сообществом, причем виды могут отличаться по физиологическим характеристикам. Так, род *Staphylococcus* является галотолерантным, способным выживать при 20% NaCl в среде. При этом состав бактерий в смешанной культуре [5], а также биомасса биопленки может варьировать, в том числе при действии антибактериальных факторов разной природы, включающих антибиотики, бактериофаги и бактериостатики. Поскольку в ряде случаев, например, при инфекции мочевыводящих путей, отеке ран концентрация соли в биотопе может превышать физиологическую (~140 мМ) и достигать 250-270 мМ [6], поэтому

изучение действия антибактериальных препаратов на формирование смешанных биопленок на фоне высокого осмотического давления является актуальным.

В связи с этим цель работы - исследовать биопленкообразование моновидовых и смешанных культур условно-патогенных микроорганизмов *E. coli* K12 и *S. epidermidis* при действии хлоргексидина, бактериофага, хлорамфеникола и цефтриаксона, на фоне 2% NaCl.

Материалы и методы

Культивирование бактерий *S. epidermidis* ATCC 29887 и *E. coli* K12 TG1 (pXen7) [7] проводили на LB среде в 96-луночных полистироловых плоскодонных планшетах (Медполимер, Россия) в присутствии хлорамфеникола (1-200 мг/л), цефтриаксона (1-200 мг/л), фиобактериофага поливалентного (разведение в 10-400 раз), 0.05% водного раствора хлоргексидина биглюконата (разведение в 10-800 раз) в термостате при 37°C. В ряде вариантов конечная концентрация NaCl была 2%. Моновидовые и смешанные культуры *S. epidermidis* и *E. coli* K12 (соотношение 1:1 по 10^6 кл/мл) вносили по 200 мкл.

Биомассу биопленки определяли через 24 ч. Для этого биопленку отмывали физиологическим раствором, высушивали и окрашивали 1% генцианвиолетом. К окрашенной биопленке добавляли 100 мкл 96% спирта и определяли спектрофотометрически (ОП580) на мультипланшетном ридере Synergy H1 TM (BioТес, США) [8].

Повторность экспериментов трехкратная. Статистическая обработка проводилась с использованием программы Excel, рассчитывая среднее арифметическое, стандартное отклонение, *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Показано, что смешанная и моновидовая биопленка *E. coli* была выше чем у *S. epidermidis* при 0.9% NaCl, в то время как при 2% NaCl – ниже (Рис. 1, контроль). Сравнимая биомасса смешанной биопленки с моновидовой биопленкой *E. coli*, вероятно, свидетельствует о том, что присутствие *E. coli* определяет биопленкообразование при ассоциации со *S. epidermidis*.

При действии хлоргексидина в разведениях 10-400 раз в условиях 0.9% NaCl биопленкообразование всех вариантов снижалось по сравнению с контролем (Табл. 1). На фоне высокого осмотического фактора, только биомасса биопленок *S. epidermidis* снижалась под влиянием препарата. Если учитывать совместное действие бактериостатика и 2% NaCl, то только в случае моновидовой биопленки *E. coli* формировалась меньшая биомасса (Рис. 1, а).

Эффективное влияние бактериофага на замедление формирования биопленок по сравнению с контролем отмечено для всех типов культур, за исключением высоких разведений препарата (более 100 раз) в отношении *S. epidermidis* (Табл. 1) при 0.9% NaCl. На фоне 2% NaCl – бактериофаг не действовал на *S. epidermidis* и, вероятно, поэтому не препятствовал формированию его моновидовой биопленки. В отношении смешанной культуры бактериофаг снижал биомассу биопленки только при разведении менее, чем 50 раз. При сравнении одинаковых концентраций бактериофага действие осмотического фактора не проявлялось как в отношении моновидовых, так и смешанных биопленок (Рис. 1, б).

Хлорамфеникол снижал биомассу моновидовой биопленки *E. coli* по сравнению с контролем, в то время как стимулировал формирование биопленки смешанной культуры со *S. epidermidis* (Табл. 1, Рис. 1, в) с 0.9% NaCl. Вероятно, присутствие в биопленке ассоцианта, на которого антибиотик не действует, способствовало выживанию *E. coli*. При повышении осмотического давления, действие антибиотика на все типы биопленок не отмечено.

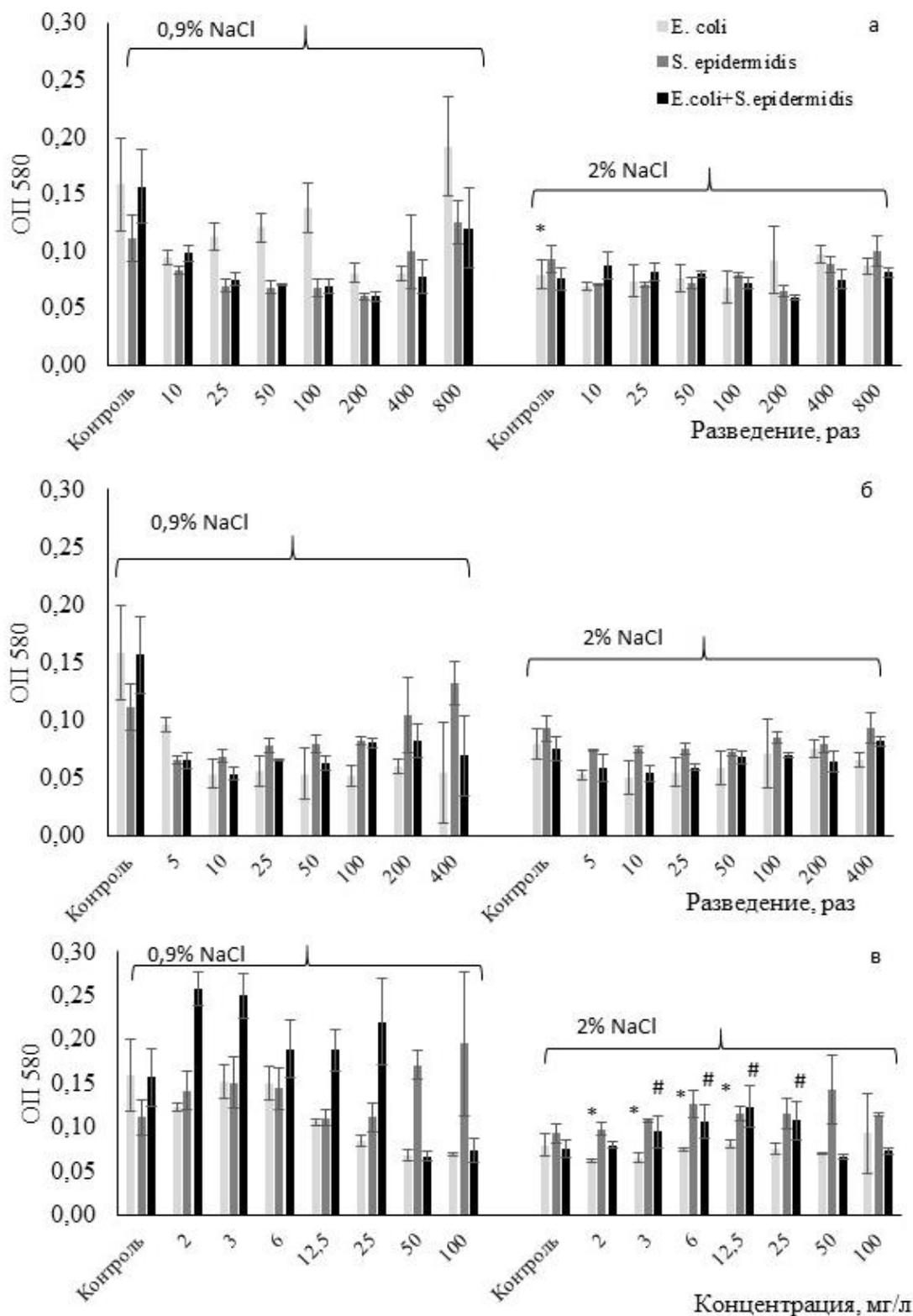


Рис. 1. Формирование моновидовых и смешанных биопленок *E. coli* K12 и *S. epidermidis* в присутствии хлоргексидина (а), бактериофага (б), хлорамфеникола (в) на фоне повышенного осмотического давления. * - достоверные отличия по сравнению с моновидовыми биопленками при 0,9% NaCl. # - достоверные отличия по сравнению со смешанными биопленками при 0,9% NaCl.

В данном случае лимитирующим фактором, вероятно, выступает высокая осмоляльность среды. При сравнении одинаковых концентраций хлорамфеникола ингибирующее действие осмотического фактора проявлялось в отношении смешанной и моновидовой биопленки *E. coli* (Рис. 1, в).

Кроме того, в работе использовали антибиотик - цефтриаксон, действующий на оба вида исследуемых бактерий. При всех условиях антибиотик снижал биомассу биопленок по сравнению с контролем вне зависимости от осмотического фона (Табл. 1).

Таким образом, действие ряда препаратов (хлоргексидин и хлорамфеникол) не проявлялось на фоне высокого осмотического давления, т.к. 2% NaCl препятствовал биопленкоформированию смешанных и моновидовых культур *E. coli* K12. Бактериофаг и цефтриаксон – препараты с широким спектром, действовали эффективно на смешанные биопленки, однако при высоком осмотическом фоне их действующая концентрация снижалась. Поэтому, вероятно, в ряде биотопов с повышенным содержанием солей применение антибактериальных препаратов может оказаться не эффективным.

Таблица 1.

Действие антибактериальных факторов на формирование смешанных и моновидовых биопленок при разном осмотическом окружении.

Антибактериальный фактор	Концентрация NaCl, %	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i> + <i>S. epidermidis</i>
Хлоргексидин	0.9	p<0.05*	p<0.05 (до разведения в 400 раз)	p<0.05 (до разведения в 400 раз)
	2	p>0.05	p<0.05 (до разведения в 400 раз)	p>0.05
Бактериофаг	0.9	p<0.05	p<0.05 (до разведения в 100 раз)	p<0.05
	2	p<0.05	p>0.05	p<0.05 (до разведения в 50 раз)
Хлорамфеникол	0.9	p<0.05	p>0.05	p<0.05
	2	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Цефтриаксон	0.9	p<0.05	p<0.05	p<0.05
	2	p<0.05	p<0.05	p<0.05 (при концентрации больше 50 мг/л)

* - достоверные отличия по сравнению с биопленкой в контроле

Работа выполнена в соответствии с НИОКТРАААА-А19-119112290009-1.

Библиографический список

1. Козлова Ю., Фоменко Н., Морозова В., Саранина И., Тикунов А., Ганичев Д., Самохин А., Павлов В., Рожнова О., Бондарь И., Зенкова Е., Нимаев В., Климонтов В., Тикунова Н.В. Генетическая и биохимическая характеристика стафилококков, встречающихся в Новосибирске // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – № 8. – С. 952-958.

2. DiMuzio E.E., Healy D.P., Durkee P., Neely A.N., Kagan R.J. Trends in bacterial wound isolates and antimicrobial susceptibility in a pediatric burn hospital // *Journal of burn care and research*. – 2014. – V. 35. – № 5. – P. e304-311.
3. Moet G.J., Jones R.N., Biedenbach D.J., Stilwell M.G., Fritsche T.R. Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2004) // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2007. – V. 57. – № 1. – P. 7-13.
4. Oliveira W.F., Silva P.M.S., Silva R.C.S. et al. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants // *The Journal of hospital infection*. – 2018. – V. 98. – № 2. – P. 111-117.
5. Елтышева И.В., Затворницкий Л.Е., Масленникова И.Л. Влияние антибактериальных факторов на смешанную культуру *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis* в условиях повышенного осмотического давления // *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*. – 2020. – № 1. – С. 19-25.
6. Jantsch J., Schatz V., Friedrich D., Schröder A., Kopp C., Siegert I., Maronna A., Wendelborn D., Linz P., Binger K.J., Gebhardt M., Heinig M., Neubert P., Fischer F., Teufel S., David J.P., Neufert C., Cavallaro A., Rakova N., Küper C., Beck F.X., Neuhofer W., Muller D.N., Schuler G., Uder M., Bogdan C., Luft F.C., Titze J. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense // *Cell Metab*. – 2015. – V. 21. – № 3. – P. 493-501.
7. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьева Л.Н., Карташев Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // *Вестник МГУ, Серия 16: Биология*. – 2002. – № 3. – С. 20-23.
8. O'Toole G.F., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. // *Ann. Rev. Microbiol*. – 2000. – V. 54. – P. 49-79.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭСТРИОЛОМ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ТИМИЧЕСКИХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ iNKT КЛЕТОК

Некрасова И.В.

*ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского
федерального исследовательского центра УрО РАН, г. Пермь, Россия*

Ключевые слова: эстриол, iNKT-клетки, тимоциты.

NKT-клетки (Т-лимфоциты с функциями естественных киллеров) являются эффекторами врожденного иммунитета, обладающими цитотоксической и иммунорегуляторной активностью. У человека популяция NKT-клеток в основном представлена инвариантными (i) NKT-лимфоцитами, экспрессирующими в отличие от неинвариантных (минорная субпопуляция) Т-клеточный рецептор (TCR), имеющий только один вариант V-домена α -цепи (V α 24-J α Q), комплексированный с V β 11. TCR iNKT-клеток распознает гликолипиды, презентруемые CD1d молекулой, подобной MHC [1]. Показано, что при нормально протекающей беременности количество iNKT-клеток в периферической крови снижается, тогда как повышение их числа ассоциировано со спонтанными абортами и преэклампсией [2]. Несмотря на небольшое количество iNKT-клеток в периферической крови (до 1,2% от общего числа Т-клеток), они способны к быстрой и массивной продукции цитокинов, что определяет их роль в регуляции иммунных реакций.

Развитие беременности сопровождается существенными изменениями эндокринного статуса женщины, увеличивается выработка многих гормонов и появляются в значительных концентрациях ранее не детектируемые [3]. К числу гормонов, синтез которых в основном связан с беременностью, относится эстриол (E_3), который продуцируется фетоплацентарной единицей. Его уровень возрастает с 7-й недели беременности вплоть до родов практически в 10 раз, в то время как у небеременных женщин E_3 продуцируется в очень малых количествах и практически не определяется [4]. Помимо выполнения схожих с другими эстрогенами функций E_3 может служить маркером, отражающим состояние фетоплацентарного комплекса, поскольку для его синтеза необходима скоординированная работа ферментативных систем не только плаценты, но и плода. Кроме того, известно, что данный гормон способен эффективно регулировать функции не только репродуктивных тканей, но и иммунных клеток [5, 6].

Целью данной работы явилось исследование влияния E_3 на количество периферических iNKT-клеток, а также их предшественников в тимусе.

Материалы и методы исследования

E_3 («Biomedicals, Inc.», Германия) использовали в концентрациях, отражающих его уровень в крови соответственно в I и III триместры беременности – 2 и 20 нг/мл [4]. В качестве контроля использовали растворитель гормона.

При изучении влияния E_3 на тимический этап развития iNKT-клеток использовали тимоциты детей до года, выделенные из фрагментов тимуса, удаляемых в ходе сердечно-сосудистых операций. Полученная суспензия содержала 82-89% кортикальных тимоцитов ($CD4^+CD8^+$). Тимоциты (10^6 /мл) инкубировали с E_3 в плоскодонном 96-луночном планшете в полной питательной среде (среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ буфера HEPES, 2 мМ L-глутамин, 5×10^{-5} M2-меркаптоэтанол, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) в течение 72 ч при 37°C в условиях 5% CO_2 .

Для исследования действия E_3 на периферические iNKT-клетки использовали венозную здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста. Суспензию мононуклеаров получали центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина ($1,077 \text{ г/см}^3$). Выделенные клетки ($5 \cdot 10^6$ /мл) инкубировали в полной питательной среде (RPMI-1640 («Gibco», США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, 1 мг/мл гентамицина) в течение 48 ч при 37°C в условиях 5% CO_2 с E_3 .

После инкубации клеток фенотип лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии («Becton Dickinson», США). Для количественной оценки тимических NKT-клеток использовали антитела к инвариантной alpha-цепи T-клеточного рецептора (анти- $V\alpha 24J\alpha 18\text{TCR-PE}$) в комбинации с анти-CD3-PerCy5. Оценивали количество $V\alpha 24J\alpha 18\text{TCR}^+$ клеток в гейте $CD3^+$ -timoцитов. Периферические iNKT клетки оценивали по коэкспрессии CD3 (Anti-Human CD3 FITC), $V\alpha 24J\alpha 18\text{TCR}$ (Anti-Human $V\alpha 24J\alpha 18\text{TCR PE}$) и CD161 (Anti-Human CD161 PerCP).

Для статистической обработки результатов был использован парный *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Дифференцировка NKT-клеток происходит в тимусе из дубль-позитивных ($CD4^+CD8^+$) тимоцитов [1]. Установлено, что инкубация тимоцитов с E_3 в концентрации, характерной для III триместра беременности, снижает количество iNKT-клеток в клеточной культуре. В концентрации, отражающей уровень гормона в I триместре беременности, E_3 не оказывает статистически значимых эффектов на процессы тимической дифференцировки iNKT-клеток (рис. 1). Важно отметить, что E_3 реализует свои эффекты в

концентрации, которая наблюдается во второй половине беременности. Известно, что для начальных стадий развития и дифференцировки iNKT-клеток важна экспрессия транскрипционного фактора ROR γ t CD4⁺CD8⁺ тимоцитами [7]. При этом E₃ реализует свой негеномный эффект посредством повышения уровня цАМФ в клетках-мишенях [5], который усиливает экспрессию транскрипционного фактора FoxP3 [8], являющегося ингибитором экспрессии ROR γ t [9].

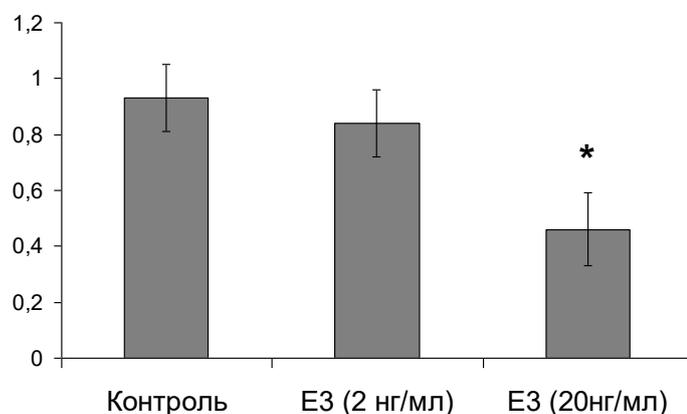


Рис. 1. Влияние E₃ на процентное содержание iNKT-клеток в тимусе

Установлено, что уровень периферических iNKT-клеток, экспрессирующих молекулу CD161, снижался под влиянием низкой дозы гормона (рис. 2). Поскольку известно, что наличие этой молекулы на поверхности лимфоцитов прямо коррелирует с продукцией ими IL-17 [10] – одного из главных цитокинов, связанных с патологией беременности, можно предположить, что в клеточных культурах E₃ снижает количество iNKT-клеток, продуцирующих данный цитокин.

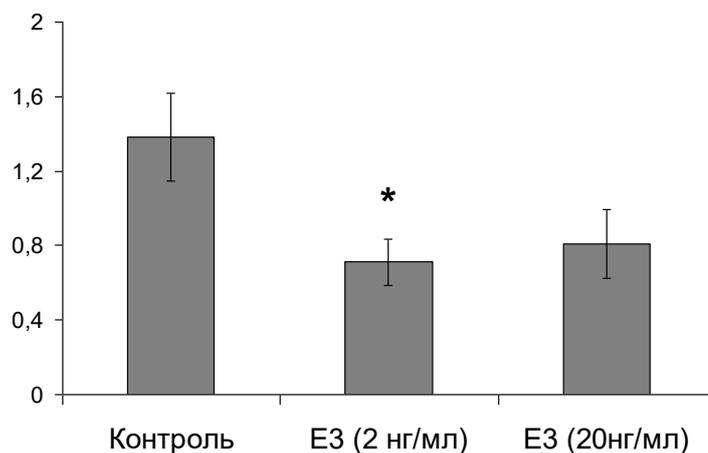


Рис. 2. Влияние E₃ на процентное содержание iNKT-клеток в периферической крови

Таким образом, нами показано, что E₃ способен эффективно регулировать процентное содержание iNKT-клеток, воздействуя также и на экспрессию молекулы CD161, связанной с продукцией IL-17. По-видимому, снижение количества iNKT-клеток в периферической крови при беременности может быть обусловлено влиянием гормонов, в том числе E₃, как на общий пул периферических NKT-клеток, так и на тимический этап формирования данного типа лимфоцитов.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290007-7.

Библиографический список

1. Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. The biology of NKT cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 25. – P. 297-336.
2. De Oliveira L., Larocca R., Sass N., Câmara N.O. Proportion of invariant NKT cells in normal pregnant women at term: an evaluation in peripheral blood, placenta and umbilical cord blood // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2011. – V. 65(1). – P. 11-12.
3. Ширшев С.В. Молекулярные механизмы гормонального и гормонально-цитокинового контроля иммунной толерантности при беременности // *Биологические мембраны.* – 2014. – Т. 31, № 5. – С. 303-322.
4. Kase N.G., Reyniak J.V. Endocrinology of pregnancy // *Mount. Sinai J. Med.* – 1985. – V. 52. – P. 11-34.
5. Ширшев С.В., Некрасова И.В. Комплексное исследование иммуномодулирующей активности эстриола // *Иммунология.* – 2011. – Т. 32. № 2. – С. 72-74.
6. Ширшев С.В., Некрасова И.В., Заморина С.А., Горбунова О.Л., Орлова Е.Г., Масленникова И.Л. Роль гормонов, ассоциированных с гестацией, в регуляции экспрессии молекул, отвечающих за функциональную активность НК-клеток // *Доклады Академии наук.* – 2014. – Т. 457. № 5. – С. 618-621.
7. Cosmi L., De Palma R., Santarlasci V. et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor // *J. Exp. Med.* – 2008. – V. 8. – P. 1903-1916.
8. Bryn T., Yaqub S., Mahic M. et al. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism // *Int. Immunol.* – 2008. – V. 20. – P. 235-245.
9. Ichiyama K., Yoshida H., Wakabayashi Y. et al. Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t // *J. Biol. Chem.* – 2008. V. 283. – P. 17003-17008.
10. Fergusson J.R., Fleming V.M., Klenerman P. CD161-expressing human T cells // *Front. Immunol.* – 2011. – V. 2(36). – doi: 10.3389/fimmu.2011.00036.

ПОЙМЕННЫЕ ЭКОСИСТЕМЫ РЕКИ САМАРЫ КАК КОМПОНЕНТ УРБАНИЗИРОВАННОЙ СРЕДЫ (В ЧЕРТЕ Г.О. САМАРА)

Новокрещенова А.С., Галкина А.С.

ФГБОУ ВО Самарский государственный социально-педагогический университет, г. Самара, Россия.

Ключевые слова: пойма, рекреация, урбанизация, Самара

Куйбышевский внутригородской район расположен в юго-западной части г.о. Самары и отделён от остальной его части рекой Самарой. Район образован в 1943 году, является сравнительно молодым. На территории района располагаются крупные промышленные предприятия (АО «Волга-Бурмаш», Кряжский завод ЖБК, АО «Волготрансстрой», АО «Водолей», Самарская ремонтная эксплуатационная база Нефтефлота, АО «Самарский мукомольный завод № 2», АО «Самарское межрайонное дорожное ремонтно-строительное управление», Городские очистные сооружения, Куйбышевский нефтеперерабатывающий завод, Кирпичный завод, Завод минерально-ватных изделий и другие предприятия), жилые

кварталы городского и поселкового типа, дачные массивы, сельскохозяйственные угодья, лесолуговые пойменные комплексы, водоёмы и некоторые другие.

Пойменные экосистемы р. Самары в черте города и на пригородных территориях практически не охраняются, в связи с чем регламентации хозяйственного, рекреационного воздействия и загрязнения среды не осуществляется. Это привело в утрате биологического разнообразия, нарушению ландшафтов, росту ПДК загрязняющих веществ [2-7, 9-12].

Ряду природных объектов ранее был присвоен статус памятников природы местного значения, в их числе озеро Гатное и озеро Светлое. Однако в настоящее время этот статус официально не подтвержден. Сохранившиеся участки естественной растительности самарской поймы служат целям рекреации. Урбанизированные территории постоянно увеличиваются по площади и «поглощают» естественные угодья. Наблюдается не только прямое уничтожение растительного покрова, но и косвенное влияние неблагоприятных факторов вследствие загрязнения среды, что негативно сказывается на пойменной экосистеме.

Единственной охраняемой территорией (статус памятника природы регионального значения) является «Самарское устье» - площадь около 262 га (рис.). Выгодным с точки зрения сохранения объекта является его островное положение, что в какой-то мере препятствует рекреации. Остальные пойменные объекты испытывают значительную рекреационную и хозяйственную нагрузку.

Куйбышевский район – район газо- и нефтехимии. Становление химического комплекса началось в послевоенный период и с самого начала было сопряжено с увеличением степени загрязнения окружающей среды. Лишь в последние годы экологической безопасности города стало уделяться какое-то внимание. Для сохранения чистоты среды и обеспечения здоровья населения может быть использован следующий план мероприятий [1], включающий:

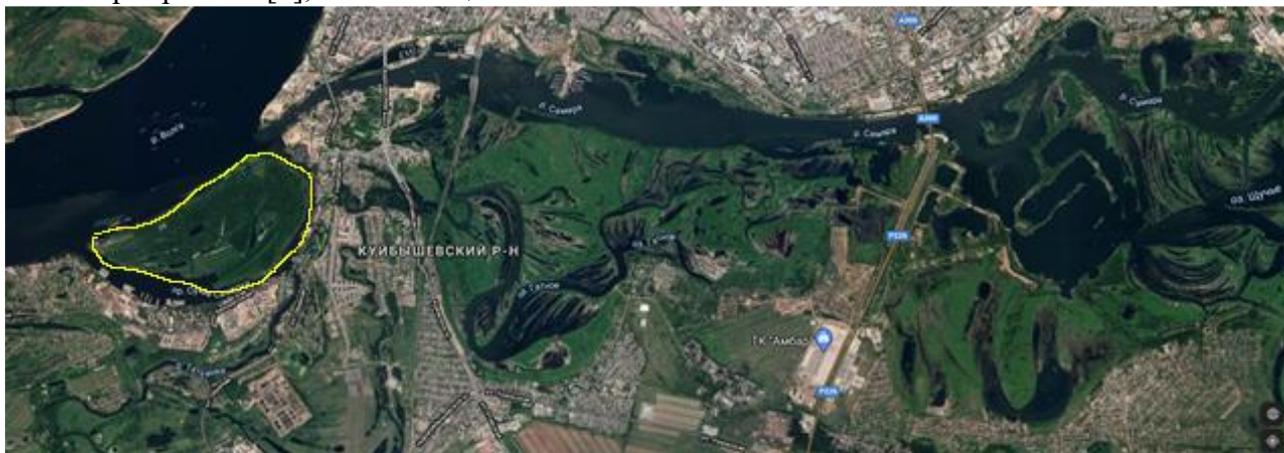


Рис. Пойменные территории в границах г.о. Самара (желтым цветом выделен памятник природы регионального значения «Самарское устье»)

1) обеспечение промышленной и экологической безопасности: внедрение импортного оборудования; изготовление оборудования и трубопроводов из высокопрочных материалов со значительным запасом прочности; осуществление сбора, предварительной подготовки, переработки транспортировки газа и газового конденсата по закрытой системе, исключая прямой контакт вредных компонентов с окружающей средой; снабжение процесса получения серы установками доочистки, позволяющими повысить степень извлечения серы из природного газа до 99,9%; исключение неорганизованных источников загрязнения за счёт применения широко разветвлённой факельной системы; система

электрохимической и ингибиторной защиты оборудования от коррозии; решение вопроса по очистке и использованию очищенных сточных вод;

2) экологическая экспертиза – исследования по степени техногенного воздействия на окружающую природную среду;

3) сотрудничество (как с отечественными, так и с зарубежными коллегами);

4) охрана воздушного бассейна: перевод автотранспорта на потребление газомоторного топлива; ввод в эксплуатацию установок доочистки выбросов загрязняющих веществ;

5) охрана почв: предотвращение (по мере возможности) загрязнения почв и поверхностных водоёмов; грамотная утилизация отходов производства;

6) охрана поверхностных водоёмов и грунтовых вод: система оборотного водоснабжения производства; лабораторный контроль за качеством подготовки используемых стоков;

7) в перспективе - реконструкция биологических очистных сооружений, утилизация попутного газа, модернизация оборудования.

Исследуемый нами круг вопросов (мониторинг флоры и растительности) вполне вписывается в пункт 2 (Экологическая экспертиза) данного плана.

Растения как компонент экосистемы реагируют на состояние природной среды и могут служить индикатором для оценки этого состояния. Под действием фитотоксикантов (окислов азота, органических соединений, фтористого водорода) происходит нарушение метаболизма у дикорастущих и культурных растений, в частности водного режима, азотного обмена, фотосинтеза, дыхания. Один и тот же уровень загрязнения вызывает неоднозначные изменения у разных видов растений, что даёт возможность использования биоиндикационных свойств при проведении экологической экспертизы [8]. Кроме того, воздействия, оказываемые предприятиями химической промышленности, вызывают нарушение структуры фитоценозов, что также может быть использовано в качестве экспресс-метода оценки качества среды.

В связи с этим охрана пойменных экосистем в черте г.о. Самара и Волжском районе Самарской области требуют пристального внимания, тщательной подготовки и реального контроля.

Библиографический список

1. Гафаров Н.А. Политика предприятия «Оренбург ГАЗПром» в области промышленной и экологической безопасности // Проблемы степного природопользования и сохранения природного разнообразия. – Оренбург: Печатный Дом ДИМУР, 1998. – С. 43-58.

2. Голубая книга Самарской области: Редкие и охраняемые гидробиоценозы / под ред. чл.-корр. РАН Г.С. Розенберга и д.б.н. С.В. Саксонова. – Самара: Самар. НЦ РАН, 2007. – 200 с.

3. Ильина В.Н., Соловьева В.В., Митрошенкова А.Н. Основные вопросы ботанического краеведения: учебное пособие для студентов естественно-географического факультета. – Самара: СГСПУ, 2020. – 230 с.; илл.

4. Козловская О.В., Ильина В.Н. Современное состояние флористического комплекса Лопатинских озёр (Волжский район Самарской области) // Сборник трудов шестого международного экологического конгресса (восьмой международной научно-технической конференции) "Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов" ELPIT 2017, 20-24 сентября 2017 г., г. Самара - Тольятти, Россия: Издательство "ELPIT". Отпечатано в АНО "Издательство СНЦ". – 2017. – Т.2, Научный симпозиум "Биотические компоненты экосистем". – С. 66-68.

5. Кривина Е.С., Малышева А.А., Тарасова Н.Г., Третьякова Т.П., Уманская М.В. Экологическое состояние малых водоемов различного природоохранного статуса (Самарская область) // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2020. – № 4. – С. 128–148.
6. Матвеев В.И., Соловьева В.В. Проблемы охраны и рекреационного использования водоемов г. Самары и пути их решения // Методология и методика науч. исслед. в области естествознания: Материалы Всерос. науч.-практич. конфер., посвящ. 100-летию д.б.н., проф. Л.В. Воржевой. – Самара, 2006. – С. 240-249.
7. Митрошенкова А.Е., Ильина В.Н. Эколого-биологическая характеристика флоры поймы реки Татьянки (Самарская область) // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2020. – Т. 29. – № 1. – С. 107-114. DOI 10.24411/2073-1035-2020-10306
8. Парибок Т.А., Сазыкина Н.А., Троицкая Е.А., Тэмп Г.А. Высшие растения как биоиндикаторы загрязнения окружающей среды металлами // Тезисы докладов 7 делегатского съезда Всесоюзного ботан. общества. Донецк 11-14 мая 1983 г. – Л.: Наука, 1983. – С. 319.
9. Соловьева В.В., Саксонов С.В., Матвеев В.И. Озера Самары: история, биоразнообразие, проблемы охраны. – Тольятти: Кассандра, 2014. – 128 с.
10. Ясюк В.П., Митрошенкова А.Е. Биоразнообразие водоёмов урбанизированных территорий (на примере озера Банного) // Исследования в области биологии и методики её преподавания. Межвуз. сб. научн. тр. Вып. 3(2). – Самара: СГПУ, 2003. – С. 156-162.
11. Ясюк В.П., Митрошенкова А.Е. Кряжские озёра // Краеведческие записки. Вып. XIV. – Самара, 2010. – С. 9-19.
12. Ясюк В.П., Митрошенкова А.Е. Алексеевские озёра // Биоэкологическое краеведение: мировые, российские и региональные проблемы / Материалы 2-й Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием, посвящ. 110-лет. юбилею д.б.н., проф. Д.Н. Флорова и 75-летнему юбилею к.б.н., проф. М.С. Горелова. – Самара: ПГСГА; ООО «Порто-принт», 2013. – С. 183-205.

ТИРОКСИН И БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ У СЛУЖЕБНЫХ БЕЛЬГИЙСКИХ ОВЧАРОВ (МАЛИНУА) В ПЕРИОД ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ

Норов А.И., Садыкова Ю.Р.

ФГК ВОУ ВО Пермский институт войск национальной гвардии Российской Федерации, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: бельгийская овчарка (малинуа); тироксин; протеинограмма; половое созревание

Период полового созревания, как показано многочисленными исследованиями, является одним из выраженных критических периодов постнатального онтогенеза [1]. Он сопровождается мощными перестройками фактически всех функциональных систем организма животных, и в особенности, гормональными сдвигами, предопределяющими становление организма и его систем к возрасту физиологической зрелости [2, 3]. Особая роль принадлежит стероидным гормонам [4]. Наряду с тем, показаны изменения и в других гуморальных регуляторных системах, в частности, деятельности щитовидной железы [5]. Это доказывает тесную связь систем регуляции и интеграции, и свидетельствует о синхронных перестройках всех видов обмена. В связи с чем, для служебной кинологии

представляет интерес в изучении параметров белкового обмена и регуляторных факторов в период возрастного становления, особенно, при взрослении и переходе к физиологической зрелости, что станет ценным для прогнозирования возможностей применения собак на службе, а также в племенном разведении.

Цель работы – оценка деятельности щитовидной железы в комплексе с белковым профилем сыворотки крови у служебных собак породы бельгийская овчарка (малинуа) во время полового созревания.

Объекты и методы. Объектом исследования были собаки породы бельгийская овчарка (малинуа) ремонтного применения в динамике в возрасте 9 месяцев и 14 месяцев. Выборка составила 8 собак – однопометников обоего пола. Кормление собак осуществлялось сухим полнорационным кормом Royal Canine. У клинически здоровых собак натошак получали венозную кровь, далее сыворотку, в которой биохимическими методами определяли следующие показатели: методом электрохемилюминесцентного анализа на автоматическом анализаторе Cobas e411(Япония) – уровень тироксина свободного (Т4), биуретовым методом на анализаторе ILab Taurus (Япония) – концентрацию общего белка, колориметрическим нефелометрическим методом – процентное содержание фракций белка сыворотки (альбуминов, α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулинов). Данные статистически обрабатывали и подвергали корреляционному анализу.

Результаты исследования. Концентрация сывороточных белков и тироксина изменилась за период исследования. Так, содержание изучаемого гормона возросло на 27% с 17,2 пмоль/л до 23,8 пмоль/л ($p \leq 0,05$), на обоих этапах составляя нормативные значения с более высокой вариабельностью к концу исследования. Этому сопутствовала тенденция к повышению уровня общего белка, с 55 г/л до 59 г/л, при этом в более взрослом возрасте данный показатель был самым стабильным из всех изучаемых, что говорит о стабилизации белкового обмена к взрослению. Наряду с этим, произошло значимое перераспределение содержания белков в протеинограмме (рис. 1). Очевидно, что наибольшие изменения коснулись альбуминов, α_2 - и β -глобулинов. Несмотря на то, что свободный тироксин, являющийся функционально наиболее активным, не связывается с белками плазмы, можно предположить, что синхронно произошло увеличение связанного Т4, транспортируемого альбуминами и β -глобулиновыми белками.

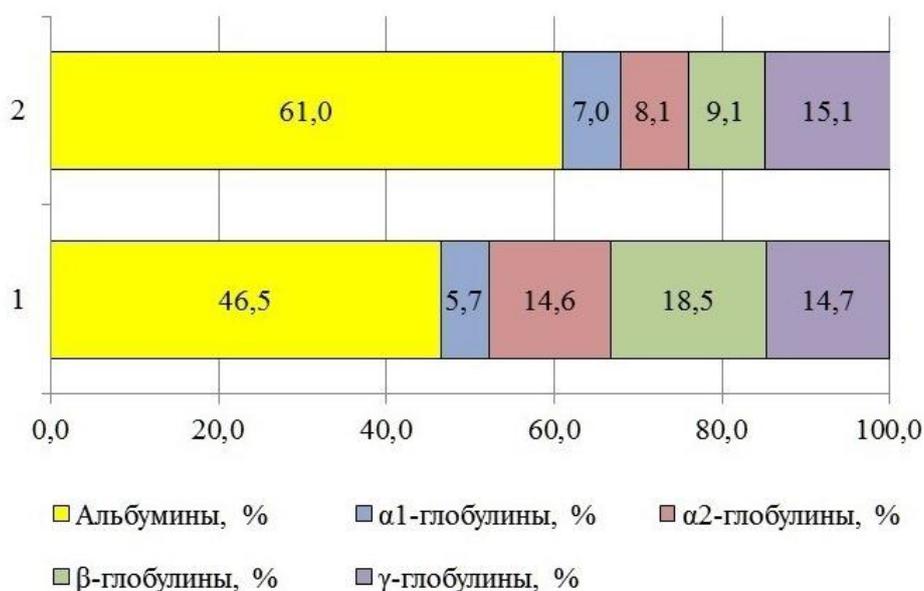


Рис. 1. Протеинограмма сыворотки крови малинуа в 9 месяце (1) и 14 месяцев (2)

Референтные интервалы процентного содержания альбуминов различаются в разных источниках, в среднем не превышая 60%. Следовательно, в период завершения полового созревания наблюдается тенденция к некоторой гиперальбуминемии, вероятно, обусловленная гармонизацией сложных подростковых метаболических перестроек, в том числе, протеинового профиля организма. С другой стороны, высокая в начале полового созревания доля β -глобулинов может свидетельствовать о сдвигах липидного обмена и отражать доминирующую роль стероидов в регуляции полового созревания, вероятно, и влияние типа корма. Этот показатель, а также и α_2 -глобулиновая фракция нормализуются к 14 месяцам. Причины нарушения иммунного статуса не берутся в учет, так как доля γ -глобулиновой фракции нормативна в оба периода работы. Оценка коррелятивных отношений между возрастом и изучаемыми показателями убедительно доказывает зависимость именно по β -глобулинам ($r = 0,68$). Данные показатели в большей степени зависели и от половой принадлежности, особенно смещения от нормы выражены в 9 месяцев у самок, что, по всей видимости, показывает более ранние активные перестройки половой функции. В конце опыта такой связи не отмечалось.

Оценка влияния функциональной активности щитовидной железы на белковый профиль крови выявила достаточно тесную корреляцию ($p \leq 0,05$), значительно меняющуюся с возрастом по некоторым белковым фракциям (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость показателей белкового обмена от уровня свободного тироксина

Общий белок	Альбумины	α_1 -глобулины	α_2 -глобулины	β -глобулины	γ -глобулины
$r = 0,58$	$r = -0,76$	$r = -0,69$	$r = 0,69$	$r = 0,55$	$r = -0,61$
$r = 0,47$	$r = -0,82$	$r = 0,49$	$r = 0,59$	$r = 0,42$	$r = -0,45$

Так, если в активный период полового созревания на 1 этапе исследования все показатели в корреляции выше среднего уровня показали роль тироксина, особенно его метаболическую диссимилятивную функцию в отношении альбуминовой, α_2 -глобулиновой и γ -глобулиновой фракций, то к периоду завершения полового созревания эти связи несколько ослабевают. Исключение составили альбумины, отрицательная корреляция с которыми для Т4 отражает его сильное метаболическое влияние на белковый обмен.

Заключение. В работе изучались некоторые биохимические показатели крови служебных собак породы бельгийская овчарка (малинуа) в период полового созревания. В 9 месяцев собака является уже юниором, дрессируется, и по онтогенетическим параметрам находится в активной пубертатной перестройке всех систем организма. Завершающие стадии полового созревания знаменуют переход животного к физиологической зрелости, к гармонизации взаимообусловленности физиологических процессов, к уравниванию организма в отношениях с окружающей средой, к более высокой стресс-устойчивости, и, главное, к возможности выполнить репродуктивную функцию, как биологической особи. На примере таких важных параметров, как уровень свободного тироксина, отражающего функциональную активность щитовидной железы, а также белкового профиля крови, как важнейшего параметра метаболических процессов, были изучены изменения, происходящие в половом созревании. Показано активное влияние тироксина на белковый обмен, а также изменения в протеинограмме, свидетельствующие о начальном диссонансном метаболическом состоянии на первом этапе исследования и дальнейшей стабилизации процессов в ходе взросления. Результаты работы убедительно доказывают на примере служебной породы собак – бельгийской овчарки (малинуа), что период полового

созревания у млекопитающих сопряжен со сложнейшими перестройками организма и является значимым критическим периодом онтогенеза, от успешности прохождения которого во многом зависит качество жизни репродуктивно и физиологически зрелой особи.

Библиографический список

1. Добрынина И.В. и др. Онтогенез и критические фазы развития человека и животных // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2008. – № 4 (20). – С. 73-75.
2. Дюльгер Г.П. Физиология размножения и репродуктивная патология собак. – М.: Колос, 2002. – 152 с.
3. Сотская М., Московкина Н. Племенное разведение собак. – М.: Аквариум-Принт, 2006. – 304 с.
4. Торранс Э., Муни К. Эндокринология мелких домашних животных. – Практическое руководство. – М.: Аквариум-Принт, 2006. – 312 с.
5. Балабаев Б.К., Дерхо М.А. Возрастные особенности тиреоидного статуса и белкового обмена в организме животных казахской белоголовой породы // АПК России. – 2016. – Т. 23. – № 3. – С. 640-645.

ИНВЕРСИЯ ЗУБНОГО ЗАМКА СРЕДИ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ПОДСЕМЕЙСТВ PISIDIINAE И SPHAERIINAE (СЕМ. SPHAERIIDAE)

Овчанкова Н.Б.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: двустворчатые моллюски, Sphaeriidae, инверсия.

В малакологической литературе неоднократно упоминалось о нахождении раковин сфериид с инвертированным замком [5; 6; 7; 8]. Результатом инверсии является нахождение в правой створке зубов, обычно располагающихся в левой створке, и наоборот [1]. Как отмечалось в литературе [5], инверсии встречаются у всех шаровковых, но внутри каждого вида не очень часто. Изучение инверсий замка актуально не только при фенетических исследованиях, но и при реконструкциях филогенетических путей развития различных групп двустворчатых моллюсков [1].

На предмет инверсий зубов замка нами был исследован 1151 экземпляр пресноводных двустворчатых моллюсков подсемейств Pisidiinae (*Pisidium moitessierianum* Paladilhe, 1866, *P. amnicum* (O.F. Müller, 1774)) и Sphaeriinae (*Musculium lacustre* (O.F. Muller, 1774), *Sphaerium asiaticum* (Martens, 1864), *Sph. solidum* (Normand, 1844), *Sph. rivicola* (Leach in Lamarck, 1818), *Sph. corneum* (Linnaeus, 1758), *Sph. nucleus* (Studer, 1820), *Sph. ovale* (Férussac, 1807) и *Sph. scaldianum* (Normand, 1844)), собранный в водных объектах бассейна Верхней и Средней Камы в период 2012-2018 гг.

При рассмотрении возможных форм инверсий нами была использована последняя трактовка системы индексации зубов замка [3], поскольку универсальная система [4] несколько иначе трактуется разными авторами [2; 3].

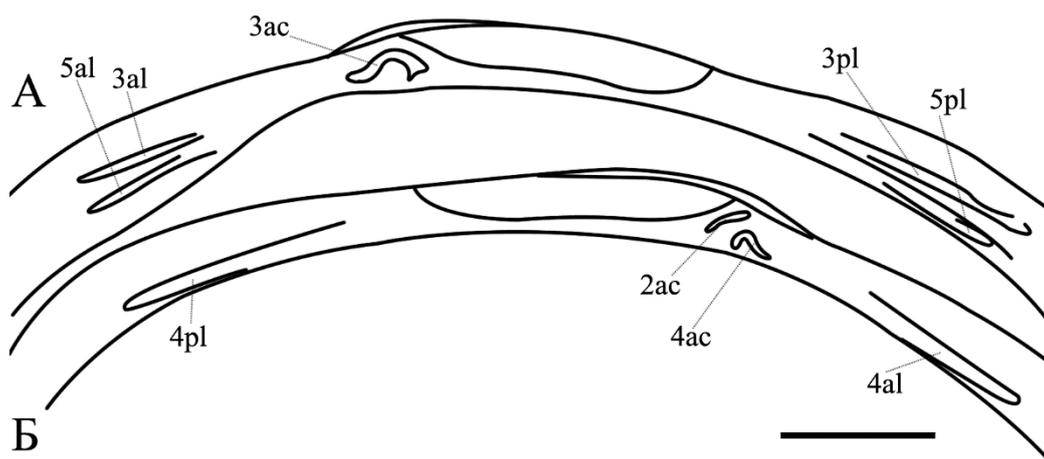


Рис. 1. Схема замка *Sphaerium rivicola*, развивающегося в норме. А – правая створка, Б – левая створка. Шкала 1 мм. (Ориг.). Обозначение индексов приведено в тексте ниже по: [3].

Таблица

Матрица признаков инвертированных замков двустворчатых моллюсков семейства

Sphaeriidae

Разрешённая форма инверсии	Признаки замка*					
	1	2	3	4	5	6
Кардинальная	4pl	3ac ⁱ	4al	3al 5al	2ac ⁱ 4ac ⁱ	3pl 5pl
Кардинально-латеральная-1	3pl ⁱ 5pl ⁱ	3ac ⁱ	4al	3al 5al	2ac ⁱ 4ac ⁱ	4pl ⁱ
Кардинально-латеральная-2	4pl	3ac ⁱ	3al ⁱ 5al ⁱ	4al ⁱ	2ac ⁱ 4ac ⁱ	3pl 5pl
Латеральная-1	3pl ⁱ 5pl ⁱ	2ac 4ac	3al ⁱ 5al ⁱ	4al ⁱ	3ac	4pl ⁱ
Латеральная-2	3pl ⁱ 5pl ⁱ	2ac 4ac	4al	3al 5al	3ac	4pl ⁱ
Латеральная-3	4pl	2ac 4ac	3al ⁱ 5al ⁱ	4al ⁱ	3ac	3pl 5pl
Полная	3pl ⁱ 5pl ⁱ	3ac ⁱ	3al ⁱ 5al ⁱ	4al ⁱ	2ac ⁱ 4ac ⁱ	4pl ⁱ

*Признаки замка: 1 – Задний(ие) латеральный(ые) зуб(ы) левой створки; 2 – Кардинальный(ые) зуб(ы) левой створки; 3 – Передний(ие) латеральный(ые) зуб(ы) левой створки; 4 – Передний(ие) латеральный(ые) зуб(ы) правой створки; 5 – Кардинальный(ые) зуб(ы) правой створки; 6 – Задний(ие) латеральный(ые) зуб(ы) правой створки. ac – anterior cardinal tooth(teeth), al – anterior lateral tooth(teeth), pl – posterior lateral tooth(teeth). Варианты инверсий зубов замка приведены в соответствии с: [1].

Мы рассмотрели все возможные комбинации зубов инвертированных замочных площадок шаровок и разработали матрицу признаков инвертированных раковин, которую рекомендуем включить в определительные ключи. В основе матрицы признаков замка (табл.) лежат индексы зубов: наружный передний (3al) и наружный задний (3pl) латеральные зубы правой створки, внутренний передний (5al) и внутренний задний (5pl) латеральные зубы правой створки и передний (4al) и задний (4pl) латеральные зубы левой створки; наружный (2ac) и внутренний (4ac) кардинальные зубы левой створки и

кардинальный зуб правой створки (3ас). В данном случае приведены индексы зубов замка, развивающегося в норме (рис. 1). В случае инвертированных замков происходят различные варианты обмена зубов между створками. При заполнении матрицы признаков инвертированных замков нами использованы индексы, помеченные «i» (inversion).

Из всех приведённых в таблице форм инверсий нами обнаружены следующие: кардинально-латеральная-2 и латеральная-2 – у *Sph. scaldianum* (рис 2).

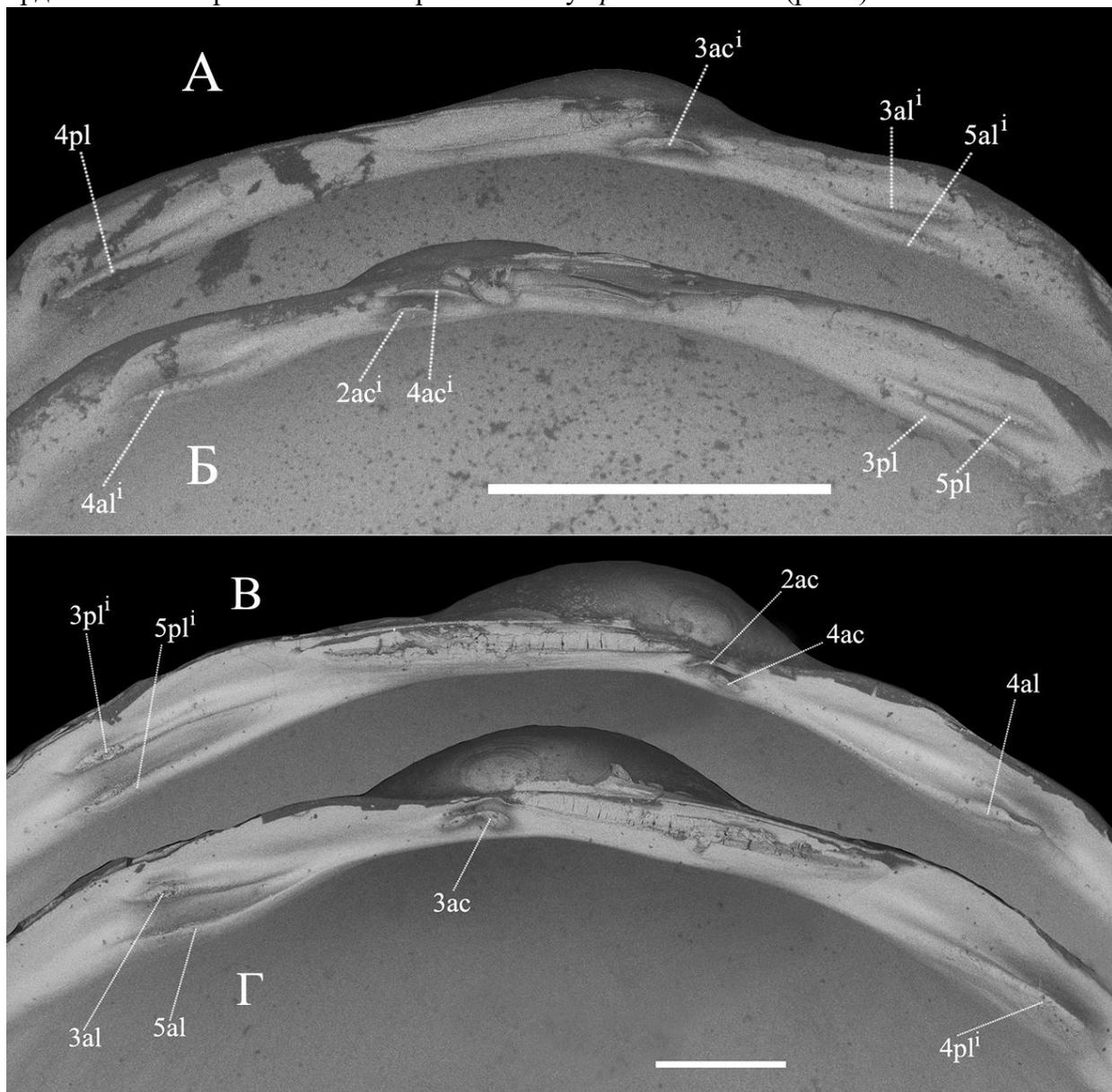


Рис. 2. Кардинально-латеральная-2 (А, Б) и латеральная-2 (Б, Г) формы инверсий замков вида *Sphaerium scaldianum*. А, В – левые створки, Б, Г – правые створки. Шкала 1 мм (А-Г). А-Г – оригинальные снимки.

Кардинально-латеральная-2 отмечена, кроме того, ещё у *Sph. rivicola* и *P. amnicum*, а латеральная-2 – у *Sph. corneum*, *Sph. ovale* и *Sph. solidum*. Латеральная-3 форма инверсии обнаружена только у *Sph. corneum* (рис. 3).

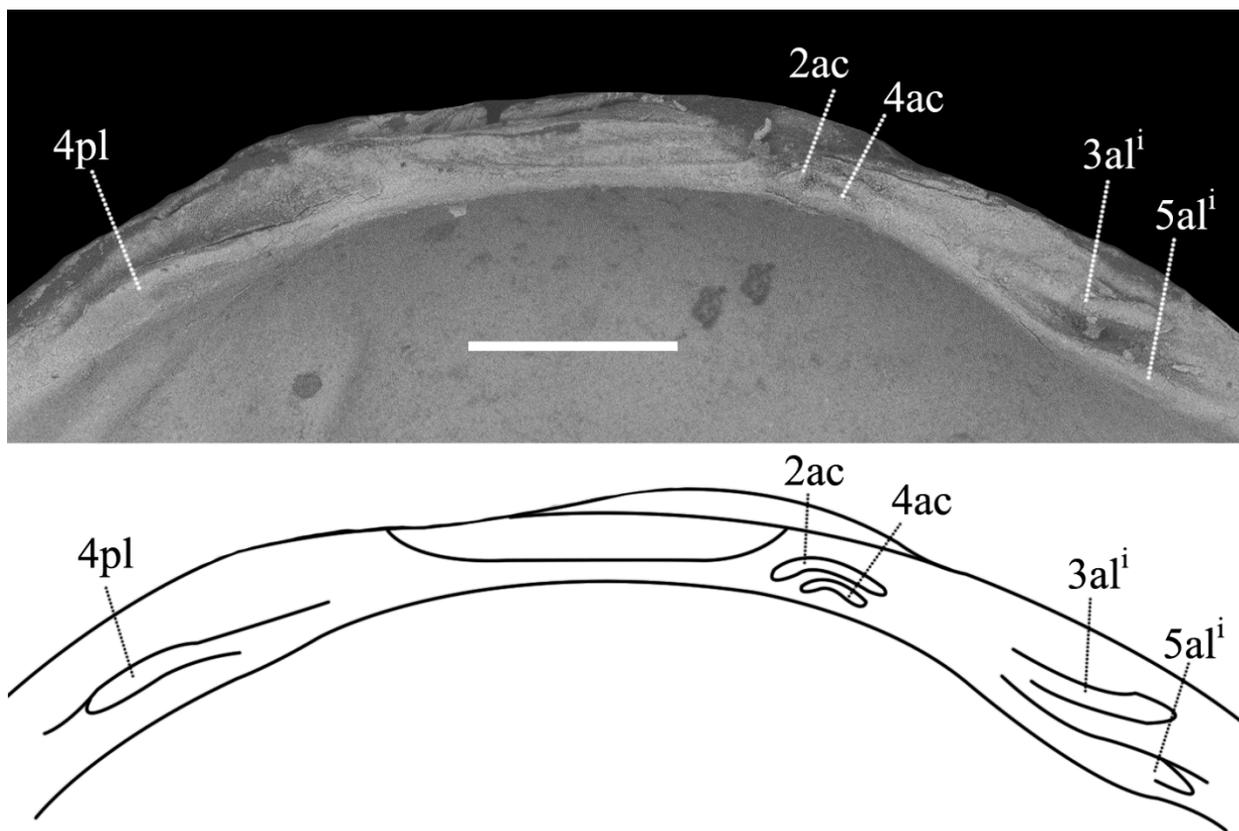


Рис. 3. Латеральная-3 форма инверсии замочной площадки левой створки *Sphaerium corneum*. Шкала 1 мм. Оригинальный снимок и иллюстрация.

Среди видов *P. moitessierianum*, *M. lacustre*, *Sph. asiaticum* и *Sph. nucleus* инверсии зубов замка в исследуемом регионе пока не выявлены.

В сравнении с литературными данными [1, 8] среди видов исследуемого региона в одинаковой степени присутствовали экземпляры с инверсией типа латеральная-2 и с кардинально-латеральной-2. Для европейских и североамериканских шаровок распространённой является инверсия типа латеральная-2, за ней следует кардинально-латеральная-2. Среди европейских и североамериканских видов распространена также полная инверсия замка, которая не была обнаружена в наших сборах.

К настоящему времени вопрос возникновения инвертированных замков среди шаровок остаётся открытым и требует дополнительных исследований в области эмбриогенеза последних, поскольку как было показано ранее [1], инвертированные замки обнаруживаются и у эмбрионов, вынашиваемых как особями с нормальными замками, так и с инверсиями последнего. Причём типы инверсий не обязательно совпадают у материнских и дочерних особей.

Автор признателен за организацию исследований на водоёмах и водотоках Прикамья сотрудников Камско-Уральского филиала ФГБУ «Главрыбвод».

Библиографический список

1. Анистратенко В.В. Инверсии зубов замка у моллюсков семейства Sphaeriidae // Зоологический журнал, 1987. Т. 66, вып. 1. С. 133-135.
2. Анистратенко В.В., Старобогатов Я. И. Новая система индексации, инверсии, состав и топография зубов замка шаровок и горошин (Mollusca, Bivalvia, Pisidioidea) // Вестник зоологии. 1989. №6. С. 11-14.
3. Корнюшин А.В. Двустворчатые моллюски надсемейства Pisidioidea Палеарктики. Киев, 1996. 175 с.

4. Скарлато О.А., Старобогатов Я.И. Опыт новой системы индексации зубов замка у двустворчатых моллюсков // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1986. Т. 148. С. 33-38.
5. Стадниченко А. П. Перлівницеві. Кулькові (Unionidae. Cycladidae). В кн.: Фауна України. Т. 29, вип. 9. Київ: Наукова думка, 1984. 384 с.
6. Старобогатов Я.И., Стрелецкая Е.А. Состав и зоогеографическая характеристика пресноводной малакофауны Восточной Сибири и Дальнего Востока // Моллюски и их роль в биоценозах и формировании фаун. Тр. Зоол. ин-та АН СССР. 1967. Т. 42. С. 221-268.
7. Kuiper J. G. L. Over inversodontie bij Sycladen. Basteria, 1943. Н. 8, S. 33-41.
8. Heard, W. H. Recent Eupera (Pelecypoda: Sphaeriidae) in the United States. Am. Midl. Nat. 1965. 74(2). S. 309-317.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ СЕРЕБРЯНСКОГО ПАРКА Г. ПЕРМИ

Олехова И.В., Новоселова Л.В.

*ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
г. Пермь, Россия*

В настоящее время на территории Серебрянского парка, расположенного в долине реки Данилиха, создается экологическая тропа в образовательных, воспитательных, рекреационных целях. Здесь сохранились посадки и реализованы идеи метода питомник-парк В.Л. Миндовского [1].

Целью работы являлось изучение биоразнообразия сосудистых растений Серебрянского парка г. Перми, что необходимо для организации экологической тропы «По следам Миндовского».

Для достижения цели были поставлены задачи: определение границ и зон Серебрянского парка; сбор и гербаризация растений; идентификация и анализ зафиксированных видов.

Обследование территории и сбор материала проводились в период с мая по август 2020 г. Определен маршрут экологической тропы на исследуемом участке. Для идентификации видов использовались определители «Иллюстрированный определитель растений Пермского края» [2] и «Травы лесов города Перми» [3].

Серебрянский парк включает три зоны: водоохранная зона, бывшие мичуринские сады, зона посадок В.Л. Миндовского.

Первая зона проходит по всей территории в части Свердловского района. Этот участок является водоохранной зоной в пойме реки Данилиха. Река имеет довольно широкую долину. Правый склон долины более крутой, русло реки извилистое, ширина русла 0,7–1,2 м, а глубина – 0,2–0,6 м. Данная территория богата видами рода ива, кленом ясенелистным, а также растениями, произрастающими на увлажненных местах [4].

Вторая зона в восточной части является зоной бывших мичуринских садов. На этой территории осталось большое число плодово-ягодных деревьев и кустарников (груша обыкновенная, слива домашняя, малина обыкновенная и т.д.). В травянистом ярусе обильно произрастает земляника ананасная, ландыш майский.

Третья зона – посадки В.Л. Миндовского, занимает западную и северную (до железнодорожных путей) части парка. Основными породами древесного яруса в данной местности являются тополь бальзамический, тополь белый и другие виды и гибриды рода тополь, береза повислая, ива козья, встречаются клен платанолистный, вяз гладкий, липа мелколистная, дуб черешчатый и др. Встречается повсеместно клен ясенелистный, он

преобладает по числу деревьев среди всех древесных видов, это обусловлено его быстрым возобновлением и другими особенностями. Вид относится к инвазивным и сорным растениям.

К настоящему времени на экологической тропе «По следам Миндовского» выявлено более 160 видов сосудистых растений, в том числе 26 видов деревьев и 28 видов кустарников из 17 семейств. В.Л. Миндовский выращивал в питомнике-парке аборигенные и интродуцированные виды, хорошо зарекомендовавшие себя в условиях северных городов. Среди деревьев-аборигенов встречаются береза повислая, вяз гладкий, вяз шершавый, дуб черешчатый, ива белая, ива козья, клен остролистный, липа мелколистная, черемуха обыкновенная, рябина обыкновенная, осина обыкновенная, лиственница сибирская. Среди интродуцентов сохранились орех маньчжурский, ясень обыкновенный, черемуха виргинская, черемуха Маака, конский каштан обыкновенный, виды и гибриды рода тополь. Кустарники представлены местными видами: боярышник кроваво-красный, калина обыкновенная, малина обыкновенная, смородина черная, шиповник иглистый и майский. Среди интродуцированных кустарников преобладают бузина красная, бересклет европейский, жимолость татарская, карагана древовидная, пузыреплодник калинолистный, сирень венгерская, сирень обыкновенная, снежноягодник приречный, чубушник обыкновенный. Интродуцированные деревья и кустарники Серебрянского парка представлены, в основном, видами Европы, Дальнего Востока, Сибири, Азии, реже географическими источниками интродуцированных видов являются Китай, Япония, Корея, Северная Америка (рис. 1).

Основу видового разнообразия Серебрянского парка представляют виды антропогенного биома, которые обычно произрастают вдоль многочисленных тропинок. Из трав наиболее часто встречаются подорожник большой, полынь обыкновенная, крапива двудомная и др. Значительная доля видового разнообразия приходится на луговые растения, такие как лютик ползучий, клевер луговой, клевер средний, однако, доминируют среди них различные виды злаковых (тимopheевка луговая, мятлик луговой и др.). Опушечный биом включает виды: черемуха обыкновенная, шиповник майский, бузина красная, вишня кустарниковая, а также 15 видов травянистых растений [5].

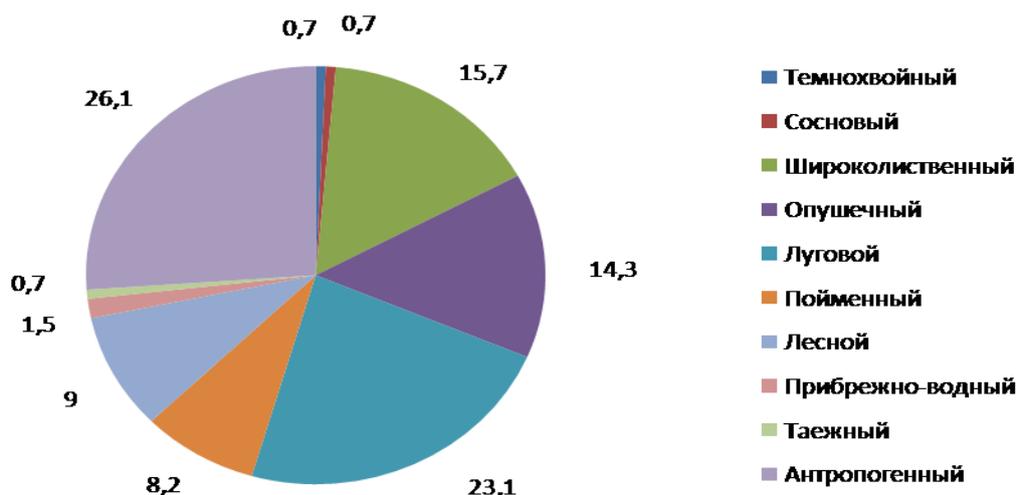


Рисунок 1. Ареал индуцированных деревьев и кустарников Серебрянского парка (всего 31 вид)

Большое число антропофитов говорит о высокой антропогенной нагрузке в виде развитой тропиночной сети, большого количества кострищ. Вдоль реки

обнаружены пни многих вырубленных деревьев вблизи ЛЭП. Антропогенная трансформация растительного покрова и чрезмерная эксплуатация растительных ресурсов в течение нескольких десятилетий приводят к постепенному обеднению флоры [6].

Библиографический список

1. Миндовский В.Л. Озеленение северных городов // Пермское книжное издательство. Пермь. 1972. 367 с.
2. Ефимик Е.Г. Овеснов С.А. Травы лесов города Перми: атлас-определитель // Управление по экологии и природопользованию администрации г. Перми; Пермский государственный национальный исследовательский университет; Пермское отделение РБО. Пермь: ООО «Пермское книжное издательство», 2018 – 200 с.
3. Овеснов С.А., Ефимик Е.Г., Козьминых Т.В. и др. Иллюстрированный определитель растений Пермского края // Книжный мир. Пермь. 2007. 743с.
4. Тимофеев В. Малые реки Перми: путеводитель. Пермь. 2018. 160 с.
5. Овеснов С.А., Ефимик Е.Г. Биоразнообразие и экология высших растений: учеб. пособие по учебной практике // Перм. гос. ун-т. Пермь. 2009. 129 с.
6. Овеснов С.А. Местная флора. Флора Пермского края и ее анализ // Перм. гос. ун-т. Пермь. 2009. 171 с.

РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ГОРМОНОВ В КОНТРОЛЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА НАТУРАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК (nTh17, nTreg, iNKT) ТИМУСА

Орлова Е.Г., Логинова О.А., Ширшев С.В.

“Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН” – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: лептин, грелин, тимус, регуляторные клетки

Метаболические гормоны, оппозитные регуляторы пищевого поведения и жирового обмена, - лептин и грелин, контролируют репродуктивные процессы, рост и развитие организма, а также обладают выраженной иммунорегуляторной активностью [1]. Большинство клеток иммунной системы, в том числе тимоциты экспрессируют рецепторы к лептину (LepR) и грелину (GHS-R) [2-4]. Оба гормона участвуют в регуляции тимопоэза при различных физиологических и патологических состояниях (стресс, беременность, голодание, возрастные изменения и тд), препятствуя атрофии тимуса, стимулируя пролиферацию тимоцитов и оказывая антиапоптотическое действие [4-6]. Стероид-индуцированная инволюция тимуса при беременности сопровождается изменением соотношения регуляторных клеток: Treg (регуляторные Т-лимфоциты), Th17 (интерлейкин-17-продуцирующие Т-лимфоциты-хелперы) и iNKT-клетки (инвариантные Т-лимфоциты с функциями естественных киллеров) и формированием иммунной толерантности к полуаллогенному плоду [7]. При нормально протекающей беременности количество iNKT, Th17 (индукторы воспалительных реакций) в периферической крови снижается, а Treg (клетки с супрессорной активностью) увеличивается, а нарушение баланса этих клеток ассоциировано со спонтанными абортами и преэклампсией [8,9]. Формирование естественных регуляторных субпопуляций (nTh17, nTreg, iNKT,) происходит в тимусе из наивных CD4⁺-предшественников, однако особенности их дифференцировки в аспекте

беременности не изучены. Уровень лептина и грелина в периферической крови при беременности значительно нарастает, что обусловлено их продукцией плацентой, увеличением объема жировой ткани и перестройкой энергетического баланса в целом [10, 11]. В наших предыдущих исследованиях показано, что лептин и грелин в концентрациях, характерных для беременности, эффективно регулируют формирование и функциональную активность как естественных, так и адаптивных регуляторных клеток [12-14]. Поэтому целью настоящей работы является изучение влияния лептина и грелина, в концентрациях, характерных для беременности, на пролиферацию и апоптоз натуральных регуляторных клеток (nTreg, nTh17, iNKT) в культуре тимоцитов.

Объектами исследования являются тимоциты, которые выделяли из фрагментов тимуса, полученных в ходе сердечно-сосудистых операций при коррекции врожденных пороков сердца в соответствии с существующей хирургической практикой. Тимэктомия проводится в соответствии с существующей хирургической практикой Федерального краевого центра сердечно-сосудистой хирургии г. Перми. Исследования проводятся согласно Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Обязательным критерием включения являлось наличие добровольного согласия со стороны законных представителей несовершеннолетних. В исследование включались только тимусы с белыми пороками развития.

Гормоны использовали в концентрациях, отражающих их содержание в периферической крови по триместрам беременности. Лептин («Sigma», США) использовали в концентрациях 35 нг/мл, соответствующей уровню гормона в периферической крови во II-III триместрах беременности [10]. Грелин («Sigma», Израиль) вносили в концентрациях 1,25 нг/мл, что сопоставимо с уровнем гормона в I и II триместрах беременности [11]. Контролем служат пробы без внесения гормонов.

Интактные тимоциты ($1 \cdot 10^6$ /мл) культивировали в присутствии гормонов в исследуемых концентрациях в 96-луночных полистироловых планшетах («Eppendorf», Германия) 72 ч при 37°C в условиях 5% CO₂. Индукцию процессов созревания и пролиферации тимоцитов проводили с использованием CD3/CD28 частиц (Gibco™, «Life Technologies» AS, Норвегия), обеспечивающих активацию клетки через T-клеточный рецептор с коstimуляцией. Пролиферативный потенциал nTreg, nTh17 и iNKT оценивали по экспрессии Ki-67 – белка, который экспрессируется только в ядрах пролиферирующих клеток. Для оценки пролиферации тимоциты культивировали с гормонами 72ч, затем оценивали количество позитивных по Ki-67 nTreg (CD4+-лимфоциты, экспрессирующие CD25 и транскрипционный фактор FOXP3), nTh17 (CD4+-лимфоциты, экспрессирующие внутриклеточный IL-17A и транскрипционный фактор ROR-c), iNKT (CD3+-лимфоциты, экспрессирующие Va24-Ja18-цепь T-клеточного рецептора) в гейте соответствующей клеточной субпопуляции. Индукцию апоптоза проводили с использованием дексаметазона (10^{-6} М, «KRKA», Словения) [15]. После инкубации оценивали количество nTreg, nTh17 и iNKT, экспрессирующих белок Bcl-2. По данным литературы, экспрессия белка Bcl-2 ингибирует апоптоз лимфоцитов [16]. Антитела, используемые для проточной цитометрии «BioLegend» (США): Alexa Fluor® 700 anti-human CD4 (clone SK3, isotype mouse IgG1, κ), Brilliant Violet 421™ anti-human Ki-67 (clone Ki-67, isotype mouse IgG1, κ), Brilliant Violet 421™ anti-Bcl-2 (clone 100, isotype mouse IgG1), APC/Cy7 anti-human CD3 (clone UCHT1, isotype mouse IgG1, κ), Brilliant Violet 421™ anti-human CD25 (clone BC96, isotype mouse IgG1, κ), PerCP/Cy5.5 anti-human IL-17A (clone BL168, isotype mouse IgG1, κ), APC anti-human TCR Va24-Ja18 (iNKT cell) (clone 6B11, isotype mouse IgG1, κ), FITC anti-human FOXP3 (clone 206D, isotype mouse IgG1, κ) и «eBioscience» (США) – PE anti-human/mouse

ROR- α /g, (clone AFKJS-9). При окрашивании клеток использовали набор специализированных буферов для транскрипционных факторов (True-Nuclear™, «BioLegend», США) и соответствующий протокол. При анализе учитывали не менее 10000 клеток. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флуоресценции окна использовали соответствующие изотипические контроли.

Результаты выражали в виде медианы с нижней и верхней квартилью – Me (LQ; UQ). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Вилкоксона для парных зависимых выборок. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Обработка графических данных, полученных в ходе цитофлуориметрии, осуществлялась с использованием программы «CytExpert 2.0». Первичную обработку данных цитофлуориметрии и фотометрии осуществляли при помощи программ «MS Office Excel.», а оценку статистических отличий – с использованием программы «STATISTICA 11.0». Нормальность распределения в выборке оценивалась тестом χ -квадрат.

Известно, что тимическая дифференцировка подразумевает два основных процесса контроля численности клеток - пролиферация и апоптоз. В результате проведенных исследований установлено, что грелин в концентрации, характерной для беременности, увеличивает количество nTreg, экспрессирующих антиапоптотический фактор Bcl-2, но не влияет на число Bcl-2⁺nTh17, Bcl-2⁺iNKT (таблица). Лептин в исследуемой концентрации не оказывает значимых эффектов на количество Bcl-2-позитивных nTh17, nTreg, iNKT (таблица). По данным литературы, для обоих гормонов характерно антиапоптотическое действие, усиливая экспрессию Bcl-2 в разных типах клеток [17, 18]. Несмотря на то, что лептин в патологических концентрациях оказывает, главным образом, провоспалительные эффекты, в концентрации, характерной для беременности, лептин не проявляет ожидаемого стимулирующего эффекта на экспрессию Bcl-2 в nTh17 и iNKT. Можно полагать что при беременности в условиях стероид-индуцированной индукции апоптоза тимоцитов, действие обоих гормонов способствует сохранению nTreg, что дополняет существующие представления о гормон-зависимых механизмах формирования иммунной толерантности.

Таблица

Регуляция лептином и грелином экспрессии Ki-67 и Bcl-2 в nTreg, nTh17 и iNKT

	Ki-67 ⁺ iNKT, %	Bcl-2 ⁺ iNKT, %	Ki-67 ⁺ nTreg, %	Bcl-2 ⁺ nTreg, %	Ki-67 ⁺ nTh17, %	Bcl-2 ⁺ nTh17, %
Контроль	12,8 (10,9-14,0)	8,3 (6,9-9,1)	16,5 (15,3-18,9)	5,8 (5,7-6,4)	20,8 (20,1-21,0)	10,9 (9,4-11,7)
Лептин 35 нг/мл	5,4 # (4,8-9,7)	7,6 (6,5-8,3)	11,6 # (7,2-14,1)	7,3 (4,4-12,0)	9,7 # (7,2-14,1)	9,6 (7,3-13,1)
Грелин 1,25 нг/мл	11,2 (9,4-12,8)	7,8 (5,9-11,4)	14,1 (13,5-22,1)	10,3 # (6,2-15,0)	15,5 (12,5-21,6)	10,6 (8,6-13,2)

Примечания: # - различия статистически значимы по критерию Вилкоксона по отношению к контролю для парных зависимых выборок при $p < 0,05$

Противоположным процессом, контролирующим численность тимоцитов, является пролиферация. Установлено, что лептин в исследуемой концентрации, препятствует пролиферации nTh17, nTreg, iNKT, снижая количество клеток, экспрессирующих Ki-67 (таблица). Грелин не оказывает влияния на число Ki-67-позитивных nTh17, nTreg, iNKT. По данным литературы, оба гормона стимулируют тимопоэз [4-6], при этом лептин эффективно усиливает пролиферацию, главным образом, CD4⁺CD8⁺-timoцитов, повышая экспрессию на них рецептора к интерлейкину-7 [19]. Возможно, выявленные особенности

гормональных эффектов лептина и грелина объясняются терминальной стадией дифференцировки nTh17, nTreg, iNKT, что согласуется с данными других авторов о их низкой пролиферативной активности [20].

В целом в совокупности с результатами ранее проведенных исследований [12-14], можно заключить, что лептин и грелин - оппозитные регуляторы энергетического гомеостаза, выступают физиологическими агентами, контролирующими дифференцировку регуляторных субпопуляций nTh17, nTreg, iNKT в тимусе, способствуя поддержанию толерантности иммунной системы матери к антигенам плода. Полученные результаты расширяют представления о механизмах действия метаболических гормонов, определяющих стратегию выживания полуаллогенного плода, что дает основание для разработки более эффективной терапии метаболических дисфункций, гормонзависимых опухолей, патологий беременности.

Работа выполнена в рамках программы НИОКТР АААА-А19-119112290007-7 «Механизмы регуляции иммунной системы».

Библиографический список

1. Tena-Sempere, M. Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis // *Horm. Metab. Res.* – 2013. - V.45.- P. 919–927.

2. Gnanapavan S., Kola B., Bustin S.A., Morris D.G., McGee P. et al The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002.- V.87.-P.2988.

3. Youm Y.H., Yang H., Sun Y., Smith R.G., Manley N.R., et al Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity // *J. Biol. Chem.* – 2009. - V.13. – P.7068-7077.

4. Dixit V.D., Yang H., Sun Y., Weeraratna A.T., Youm Y.H., et al Ghrelin promotes thymopoiesis during aging // *J. Clin. Invest.* – 2007. - V.117. - P.2778-2790.

5. Mattioli B., Giordani L., Quaranta M.G., Viora M. Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway // *FEBS Lett.* – 2009. - V.583. – P.1102-1106.

6. Martín-Romero C., Santos-Alvarez J., Goberna R., Sánchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes // *Cell Immunol.* – 2000. – V.199. – P.15-24.

7. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий: монография. Екатеринбург, 2009. 582 с.

8. Hosseini A., Dolati S., Hashemi V., Abdollahpour-Alitappeh M., Yousefi M. Regulatory T and T helper 17 cells: Their roles in preeclampsia. // *J. Cell. Physiol.* – 2018. - V.233. – P.6561-6573.

9. Saito S., Shima T., Nakashima A., Inada K., Yoshino O. Role of Paternal Antigen-Specific Treg Cells in Successful Implantation // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2016. – V.75. – P.310-316.

10. Hardie L., Trayhurn P., Abramovich D., Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. // *Clin. Endocrinol.* - 1997, - V.47. – P.101–106.

11. Fuglsang J., Skjaerbaek C., Espelund U. et al. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy // *Clin. Endocrinol.* – 2005. - V. 62, - P.554–559.

12. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Роль лептина и грелина в индукции дифференцировки ИЛ17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // *БЭБИМ* – 2013. -Т.156, №12.- 786-791.

13. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки IL-17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // Доклады академии наук. - 2014. - Т.454. - С.103–106.

14. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Роль РКА и PI3K в регуляции лептином и грелином формирования адаптивных субпопуляций регуляторных CD4⁺Т-лимфоцитов// Биохимия - 2017, - Т.82, №-9.- С.1361-1373.

15. Lépine S., Lakatos B., Courageot M. et al. Sphingosine contributes to glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes independently of the mitochondrial pathway. //J. Immunol. - 2004. - V. 173, - P. 3783-3790.

16. Yokoyama T., Tanahashi M., Kobayashi Y., Yamakawa Y., Maeda M., et al. The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. // Immunol Lett. – 2002. – V.81, - P. 107-113.

17. da Silva S.V., Salama C., Renovato-Martins M., Helal-Neto E., Citelli M., et al Increased leptin response and inhibition of apoptosis in thymocytes of young rats offspring from protein deprived dams during lactation. // PLoS One. – 2013, - V. 8, - P.e64220

18. Zhang C., Li L., Zhao B., Jiao A., Li X. et al Ghrelin Protects against Dexamethasone-Induced INS-1 Cell Apoptosis via ERK and p38MAPK Signaling. // Int. J. Endocrinol. -2016. Iss.4513051.

19. Kim S.Y., Lim J.H., Choi S.W., Kim M., Kim S.T. et al Preferential effects of leptin on CD4 T cells in central and peripheral immune system are critically linked to the expression of leptin receptor. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – V.394, - P.562-568.

20. Booth N.J., McQuaid A.J., Sobande T., Kissane S., Agius .E, et al Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4⁺ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. // J. Immunol. – 2010. – V.184, – P.4317-4326.

ВЛИЯНИЕ НАСТОЯ ЧАГИ В КОРМЕ НА НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЛУЖЕБНЫХ СОБАК

Пастухова Л.А., Казаковцев В.В.

ФГКВООУ ВО Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: служебные собаки; настой чаги; параметры функционального состояния; физическая активность.

Известно, что биологически активные кормовые добавки используются в кинологической практике для нормализации или оптимизации обмена веществ, повышения переваримости и усвоения питательных веществ рационов, коррекции иммунного статуса, улучшения рабочих качеств служебных животных. При этом до настоящего времени остаются популярными препараты природного происхождения в связи с рядом преимуществ перед их синтетическими аналогами.

Целью нашей работы было изучение влияния настоя чаги (березового гриба) в корме на некоторые функциональные показатели служебных собак.

Чага, или березовый гриб, – *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil. (Инонотус скошенный), паразитирующий на древесных породах, встречается практически по всей территории России, включая Дальний Восток и Северный Кавказ. Доказанными фармакологическими свойствами обладает сырье чаги, собранной исключительно с жизнеспособных берез [1].

По характеру биологического действия чага относится к активным биогенным стимуляторам, которые повышают защитные силы организма, стимулируют центральную нервную и нейрогуморальную системы, улучшают обмен веществ, восстанавливают активность ферментных систем, регулируют деятельность сердечно-сосудистой и дыхательной систем, обладают общеукрепляющим действием, предупреждают развитие физической усталости при наличии большой нагрузки.

Такие свойства обусловлены содержанием в сырье чаги водорастворимого полифенолкарбонового комплекса, отсутствующих в плодовых телах других трутовиков, флавоноидов, стероидных веществ (эргостерола и других), полипептидов, бетулина, некоторых других органических веществ и минеральных элементов (марганец, медь, барий, цинк, железо, кремний, алюминий, кальций, магний, калий, натрий, в основном в форме оксидов) [2, 4, 5, 6].

Объектом нашего исследования являлись собаки породы немецкая овчарка ремонтного (учебного) назначения, содержащиеся в вольерах. По принципу групп аналогов, с учетом живой массы и возраста были сформированы две группы собак: опытная (экспериментальная) и контрольная – по 5 животных в каждой (n=5).

В период проведения эксперимента (ноябрь-декабрь 2019 года) условия кормления и содержания были одинаковыми для обеих групп. Все собаки имели удовлетворительное состояние здоровья, находились на определенном ведомственными приказами рационе, предварительно были подвергнуты вакцинации (плановые профилактические прививки) и дегельминтизации. Рабочая нагрузка животных состояла из тренировок-дрессировок.

В течение 30 дней в корм опытным животным по согласованию с ветеринарным специалистом добавляли настой из аптечного препарата «Чага – «Лекра-СЭТ» (производство Алтайский край, г. Барнаул), приготовленный по инструкции к нему: 1 фильтр-пакет (массой 1,5 г) заливали 200 мл кипятка в стеклянном стакане, настаивали 15 минут, отжимали, остужали при комнатной температуре. Дозировка для каждой собаки составила по 100 мл 2 раза в сутки, т.е. препарат добавляли в миску с кормом во время каждого кормления.

В течение всего времени оценивали физиологическое состояние и поведение собак (визуально), до начала и на 30-й день эксперимента методом пальпации регистрировали пульс (ЧСС) и частоту дыхания (ЧД) до и после нагрузки, рассчитывали величины их изменения. Нагрузочное тестирование проводили на ровной асфальтовой площадке с устойчивым снежным покровом, беговым методом. Также нами оценивалась физическая активность собак, – с помощью шагомера, прикрепленного к ошейнику (количество шагов за 10 минут свободного выгула собаки). Экспериментальный материал обработан статистически методами биометрического анализа с применением критерия достоверности Стьюдента (таблица). Результаты исследования представлены в таблице, где использованы следующие обозначения: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,05$; *** – $p < 0,01$.

Состояние слизистых оболочек, деятельности желудочно-кишечного тракта и мочевыделительной системы на протяжении всего опыта не менялось. Отмечено повышение общей активности собак опытной группы относительно контрольной, в том числе во время занятий, тренировок и самостоятельной подготовки.

Измерение пульса у собак в состоянии относительного покоя показало, что до эксперимента у подавляющего большинства из них в обеих группах пульсовые значения находятся в пределах нормы, только у одной контрольной собаки пульс незначительно превышает физиологический максимум. В посленагрузочных замерах такое превышение имеют по одной собаке в каждой группе.

Донагрузочные измерения в конце эксперимента выявили превышение также у одной собаки в каждой группе (максимальные значения ЧСС в таблице), но в замерах после нагрузки повышенное значение имела только одна (контрольная) собака.

Более информативным параметром, указывающим на уровень адаптационных возможностей сердечно-сосудистой системы и организма в целом, считается пульсовая разница, которая достоверно уменьшилась только в опытной группе, однако изначально эта группа имела и более высокие показатели (почти двукратно по сравнению с контролем). Благоприятное влияние изучаемой добавки на рассматриваемый параметр подтверждается также показателями коэффициента вариации, которые демонстрируют большую стабилизацию именно в опытной группе (по всем параметрам в сравнении с контрольной).

Показатели ЧД в покое при первом измерении превысили физиологические значения у всех исследованных собак. Через 30 дней ЧД стабилизировалась: у большинства значения вошли в норму, кроме одной опытной собаки, имевшей наибольшее значение ЧД среди всех животных до проведения эксперимента, и двух контрольных собак, у которых выявлены еще большие превышения, чем у опытной (максимальные значения в таблице).

Таблица

Показатели функционального состояния собак

Параметр (нач./конец опыта)	Условия		Статистические показатели			Норма для параметров [3, 7]
			M±m	CV	Диапазон	
ЧСС (начало), кол-во в мин.	Опыт	покой	94,8±4,76	11,2	86-112	70-120 (при нагрузке – 110-140)
		нагрузка	125,2±5,35	9,6	116-144	
		разница	30,4±6,71	49,3	18-56	
	Конт роль	покой	114,4±3,19	6,2	108-126	
		нагрузка	131,2±5,99	10,2	116-148	
		разница	16,8±5,54	73,7	4-32	
ЧСС (конец), кол-во в мин.	Опыт	покой	112,4±6,21	12,4	100-136	
		нагрузка	123,6±3,25	5,9	118-136	
		разница	11,2±3,93**	78,5	0-24	
	Конт роль	покой	117,2±5,71	10,9	100-136	
		нагрузка	126,8±6,05	10,7	114-148	
		разница	9,6±5,34	124,5	-2-28	
ЧД (начало), кол-во в мин.	Опыт	покой	35,6±4,07	25,6	26-50	14–24 (в покое), до 300 (при поиске)
		нагрузка	89,2± 15,62	39,1	40-124	
		разница	53,6±14,01	58,4	14-88	
	Конт роль	покой	38,8±4,88	28,1	26-48	
		нагрузка	104,4±7,86	16,8	74-118	
		разница	65,6±11,07	37,7	26-86	
ЧД (конец), кол-во в мин.	Опыт	покой	21,6±1,75**	18,1	18-28	
		нагрузка	34,2±1,69***	11,0	30-40	
		разница	12,6±2,64***	46,8	6-21	
	Конт роль	покой	24,0±3,03**	28,3	16-32	
		нагрузка	48,0±11,54**	53,8	26-80	
		разница	24,0±8,63***	80,4	10-48	
Физическая активность (кол-во шагов)	Опыт	начало	433,0±72,50	37,4	212-591	–
		конец	257,8±57,81*	50,1	162-465	
	Конт роль	начало	430,0±104,76	54,5	183-726	
		конец	126,0±15,72	27,9	79-170	

Примечание. Достоверность различий активности (конец эксперимента) – для опытной группы относительно контрольной; пульсовой разницы, посленагрузочной ЧД и разницы ЧД – отдельно для контрольной и опытной групп (в результате эксперимента).

Еще более значимые данные были получены в результате нагрузочного тестирования. Несмотря на то, что статистически достоверные отличия показателей ЧД в группах (отдельно до и после эксперимента) отсутствуют (ввиду их высокой вариабельности), средние значения в обеих группах (в каждой отдельно) показали достоверное снижение, более значимое в опыте. Значения коэффициента вариации, уменьшающиеся к концу опыта в группе с чагой, в отличие от контрольной, также подтверждают более высокий уровень адаптационных возможностей животных на фоне изучаемой кормовой добавки.

Изучение физической активности собак с помощью шагомера при первом измерении выявило, что обе группы, не имея достоверной разницы между собой, существенно отличаются от послеекспериментальных данных (в лучшую сторону). Последнее можно объяснить тем, что в период проведения эксперимента собак начали активнее использовать на занятиях по дрессировке, то есть их физические нагрузки стали более значительными, и активность животных во время тестирования в целом снизилась.

Однако, отсутствие достоверной разницы между группами до проведения опыта с максимально близкими показателями, позволило сравнить данные окончательных измерений, которые демонстрируют значимое отличие опытной группы от контрольной. Эти результаты вполне подтверждают биологическое действие алкалоидов, содержащихся в сырье чаги [1].

Таким образом, результаты наших исследований в основном согласуются с литературными данными о благоприятном влиянии препаратов чаги на сердечно-сосудистую и дыхательную системы животных. Настой чаги в корме положительно сказывается на физической активности служебных собак.

Для более точных выводов о возможности применения настоя чаги в качестве кормовой добавки для служебных животных необходимо иметь данные о состоянии других систем организма на фоне препарата, отсутствии у него гепато- и нефротоксического действия в отношении собак, а также способности последних работать по назначению.

Библиографический список

1. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Чиков П.С. – М.: Картография, 1983. – 340 с. / <http://plant.geoman.ru/books/item/f00/s00/z0000004/st130.shtml>.
2. Баландайкин М.Э. К вопросу о химическом составе и медицинских свойствах *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil. // Химия растительного сырья. – 2013. – № 2. – С. 15–22.
3. Баранов А. Е. Здоровье вашей собаки. – М.: НПО «Римэкс», 1992.
4. Белова Н.В. О необходимости изучения биологии и биохимической активности *Inonotus obliquus* // Микология и фитопатология. – 2014. – Т. 48, вып. 6. – С. 401–403.
5. Вялых Е.В., Челнакова Н.Г., Позняковский В.М. Характеристика гриба чага и его использование в производстве экстрактов для лечебного и профилактического питания. // АПК России. – 2017. – Т. 24. – № 3. – С. 699–704.
6. Кузнецова О.Ю. Физико-химические характеристики и биологическая активность водных извлечений и полифенолоксикарбонового комплекса чаги: дисс. ... к. хим. наук. – Казань. – 2004. – С. 158.
7. Энциклопедия «Немецкая овчарка». – М.: ООО «Издательская группа «Жизнь», 2004.

СОСТАВ ОБМЕННЫХ КАТИОНОВ ВТОРИЧНО ЗАСОЛЕННЫХ АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ

Пахоруков И.В.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: аллювиальные почвы, техногенное засоление, обменные катионы

Поглотительная способность – одно из важнейших свойств, определяющих плодородие почвы и характер процессов почвообразования. От нее зависит питательный режим, накопление многих элементов минерального питания растений, реакция среды и водно-физические свойства почвы.

Особенно большое влияние на свойства почвы и условия произрастания растений оказывает состав обменных катионов. Так, у почв, насыщенных кальцием, реакция близка к нейтральной; коллоиды находятся в состоянии необратимых гелей и не подвергаются пептизации при избытке влаги; почвы хорошо оструктурены, обладают благоприятными физическими свойствами. Примером таких почв являются черноземы. Почвы, у которых в составе обменных катионов в значительном количестве ионы натрия, имеют щелочную реакцию, отрицательно влияющую на состояние коллоидов и рост растений. Насыщенные натрием коллоиды легко пептизируются; почвы плохо оструктурены, имеют неблагоприятные водно-физические свойства: повышенную плотность, плохую водопроницаемость, слабую водоотдачу, низкую доступность почвенной влаги (солонцы, солонцеватые почвы). При наличии в составе обменных катионов значительного количества H^+ и Al^{3+} почвы характеризуются обменной кислотностью, их коллоиды легко разрушаются, почвы плохо оструктурены [5].

В настоящее время генетические свойства почв часто трансформируются под воздействием антропогенных факторов. Под влиянием техногенных солей отмечены изменения химических и физико-химических свойств почв, в том числе, перестройка почвенного поглощающего комплекса (ППК) [1, 9].

В таежно-лесной зоне аллювиальные почвы сформировались в условиях водозастойного режима при участии процесса оглеения. Глееобразование – биогеохимический почвообразовательный процесс, возникающий в анаэробной среде на кислых и нейтральных породах, не содержащих сульфатов, при наличии органического вещества, способного к ферментации. При участии гетеротрофной микрофлоры продуцируются фульвокислоты и органические низкомолекулярные кислоты, поэтому для глеевых почв характерны слабокислая и кислая реакция, ненасыщенность основаниями [3, 5, 7].

В Пермском крае объекты отвально-шламового хозяйства ПАО «Уралкалий» стали источником минерализованных вод, в результате в долинах малых рек сформировались комплексы аллювиальных солончаковых почв и солончаков вторичных [4]. Нами изучена трансформация поглощающего комплекса таких почв в поймах рек Черная и Ленва, обусловленная воздействием водорастворимых солей техногенного происхождения.

В пробах почв определяли рН водной вытяжки – потенциометрическим методом; гидролитическую кислотность – по Капену; обменные кальций, магний, натрий и калий – методом Пффефера в модификации Молодцова и Игнатовой; емкость катионного обмена (ЕКО) рассчитали по сумме оснований и гидролитической кислотности.

В изученных засоленных аллювиальных почвах емкость катионного обмена (ЕКО) зависела преимущественно от их гранулометрического состава. Суглинистые и тяжелосуглинистые горизонты имели ЕКО в пределах 13–23 смоль(экв)/кг, а песчаные и супесчаные – около 5–9 смоль(экв)/кг (таблица 1, 2).

Таблица 1

Состав обменных катионов (смоль(экв)/кг) в почвах долины р. Ленвы

№ разреза	Почва	Глубина, см	pH _{вод}	Обменные катионы					ЕКО
				Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	H _{гк}	
1	Солончак соровый	0-3	5.90	6.40	2.71	4.40	2.40	2.50	18.41
		3-15	6.75	8.70	3.00	5.52	1.01	1.20	19.43
		45-55	5.85	-	-	-	-	3.70	-
2	Аллювиальная гумусовая глееватая почва	5-15	4.69	5.12	2.43	1.91	0.42	13.3	23.18
		20-30	4.47	8.00	3.03	2.10	0.31	5.64	19.08
		32-42	5.02	-	-	-	-	3.81	-
		50-60	4.16	-	-	-	-	5.60	-
		70-80	4.68	-	-	-	-	7.22	-
3	Солончак вторичный	9-19	7.23	2.80	1.20	4.77	8.82	0	17.59
		25-35	6.83	2.00	0.76	4.59	7.71	0	15.06
		45-55	6.55	1.84	0.88	4.45	6.67	0	13.84
		63-73	6.41	1.76	0.76	3.83	6.30	0	12.65
		5-15	2.97	4.72	1.88	1.70	0.88	3.41	12.59
4	Аллювиальная гумусовая глееватая почва	20-30	2.82	5.88	2.24	1.91	0.47	3.87	14.37
		40-50	3.44	7.08	2.68	2.02	0.53	4.25	16.56
		55-65	3.27	7.12	2.32	1.91	0.35	2.79	14.49
		74-84	3.33	-	-	-	-	2.62	-
		10-20	6.48	3.68	1.28	2.57	2.13	0	9.66
5	Аллювиальная гумусовая глееватая почва	21-31	5.93	2.92	1.08	2.85	2.40	0	9.25
		35-45	6.47	5.08	1.60	4.90	4.62	0	16.20
		59-69	6.89	5.12	1.36	4.45	5.25	0	16.18

Примечание. Прочерк – нет данных.

Таблица 2

Состав обменных катионов (смоль(экв)/кг) в почвах долины р. Черной

№ разреза	Почва	Глубина, см	pH _{вод}	Обменные катионы					ЕКО
				Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	H _{гк}	
1	Аллювиальная гумусовая глееватая почва	0-9	7.2	3.36	1.60	2.61	2.36	0	9.93
		15-25	7.6	2.32	0.40	3.04	3.59	0	9.35
		35-45	6.2	1.84	0.88	6.61	7.03	2.68	19.04
		50-60	5.9	2.24	1.04	6.96	7.18	3.54	20.96
		70-80	6.7	2.24	0.80	4.52	5.13	1.10	13.79
		85-95	6.4	2.48	0.88	5.22	6.15	1.65	16.38
2	Аллювиальная гумусовая глееватая почва	3-13	7.1	1.52	0.96	2.09	0.67	0	5.24
		16-26	8.0	4.40	1.52	5.57	7.38	0	18.87
		35-45	7.2	3.20	1.20	5.39	5.03	0	14.82
3	Аллювиальная гумусовая глееватая почва	2-12	7.9	3.04	2.16	6.26	5.28	0	16.74
		20-30	7.8	2.64	1.12	9.39	8.92	0	22.07
		40-50	7.6	2.32	1.28	6.61	6.77	0	16.98

Как правило, засоленные почвы обладают нейтральной или щелочной реакцией среды и насыщены основаниями [5]. Однако часть из исследованных нами почв сохранили кислую реакцию среды и ненасыщенность основаниями. Так, в солончаке соровом общая доля обменных H^+ и Al^{3+} (гидролитическая кислотность) – 6–14% ЕКО. Кислые аллювиальные почвы были слабонасыщенными ($H^+ + Al^{3+}$ – от 8 до 49%). Таким образом, в составе обменных оснований в аллювиальных вторично засоленных почвах может присутствовать не только Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , но и H^+ с Al^{3+} . Известно, что одновременное присутствие H^+ , Al^{3+} и Na^+ в почвенном поглощающем комплексе характерно для солодей, однако они не являются засоленными почвами. Солоди образуются при рассолении солонцов, обменный Na^+ постепенно вытесняется H^+ [2]. В кислых аллювиальных почвах, напротив, в почвенном поглощающем комплексе под воздействием минерализованных вод идет постепенная замена H^+ одновалентными катионами, в том числе, Na^+ .

В почвенном поглощающем комплексе аллювиальных почв доминировали Na^+ и K^+ , на их долю приходилось до 80% ЕКО. По доле обменного Na^+ исследованные почвы относятся к виду мало- и средненатриевых почв [7]. Насыщение почв натрием, по-видимому, способствует диспергированию коллоидов и разрушению почвенных агрегатов. Источником ионов калия, как и натрия, служат отходы производства, складываемые в солеотвалах и растворяющиеся в атмосферных осадках. Количество K^+ в составе почвенного поглощающего комплекса достигало аномальных значений (13–40% ЕКО), нередко превышающих долю Na^+ , особенно в почвах долины р. Черной.

Таким образом, под воздействием техногенных минерализованных вод произошла глубокая трансформация состава обменных катионов в аллювиальных почвах, что сопровождается изменением условий обитания растений, микробиоты и почвенной фауны.

Библиографический список

1. Антропогенные почвы: генезис, география, рекультивация / М.И. Герасимова и др. / Под ред. Г.В. Добровольского. Смоленск: Ойкумена, 2003. 268 с.
2. Базилевич Н.И. Лесостепные солоды. М.: Наука, 1965. 97 с.
3. Добровольский Г.В., Балабко П.Н., Стасюк Н.В., Быкова Е.П.. Аллювиальные почвы речных пойм и дельт и их зональные отличия // Аридные экосистемы. 2011. Т. 17, № 3 (48). С. 5-12.
4. Еремченко О.З., Митракова Н.В., Шестаков И.Е. Природно-техногенная организация почвенного покрова территории воздействия солеотвалов и шламохранилищ в Соликамско-Березниковском экономическом районе // Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2017. Вып.3. С. 311–320.
5. Зайдельман Ф.Р. Глееобразование как фактор почвообразования и деградации почв, способы их защиты // Почвоведение. 2017. № 7. С. 849–859.
6. Засоленные почвы России / Отв. редакторы Л.Л. Шишов, Е.И. Панкова. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. 854 с.
7. Классификация и диагностика почв России / Л.Л. Шишов, В.Д. Тонконогов, И.И. Лебедева, М.И. Герасимова / Под ред. Г.В. Добровольского. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
8. Ковда В.А. Происхождение и режим засоленных почв / Под ред. Л.И. Праслова. М.: Изд-во Академии наук, 1946. 575 с.
9. Солнцева Н.П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. М.: Изд-во МГУ, 1998. 367 с.

ШТАММ *STREPTOMYCES* SP. IB2019K190-4, КУЛЬТИВИРОВАННЫЙ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ С ОТХОДАМИ ЛЕСОПИЛЕНИЯ, КАК ПРОДУЦЕНТ ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ NFAT 133.

Переляева Е.В.¹, Краснова М.Е.¹, Моргунова М.М.^{1,2,3}, Бельшенко А.Ю.¹, Тимофеев М.А.¹, Аксенов-Грибанов Д.В.^{1,3}

¹ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

²ФГБОУ ВО Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия

³ООО Гринтех Байкал, Иркутск, Россия

Ключевые слова: актинобактерии, биотехнология, биодеструкция, озеро Байкал.

Одним из актуальных направлений современной биотехнологии выступает изучение способности микроорганизмов осуществлять деструкцию органического вещества природного и антропогенного происхождения [5, 7, 9]. Общий годовой объем отходов лесопиления измеряется миллионами кубометров, которые, обладают низкой коммерческой ценностью, занимают большие площади и загрязняют окружающую среду. Одной из экологически чистых технологий и наиболее глубоких, является утилизация отходов лесопиления с использованием микроорганизмов – биологических деструкторов [2]. Согласно определению, представленному Губернаторовой Т. Н. (2015), биологическая деструкция – это процесс разрушения какого-либо вещества в результате деятельности микроорганизмов-биодеструкторов, к которым относятся бактерии, микроскопические грибы и водоросли. Данные организмы способны разрушать различные материалы, промышленные и сельскохозяйственные отходы, гумусовые вещества, нефтепродукты, ксенобиотики, пестициды и т.д. [1].

Одной из сред обитания, в которой распространены микроорганизмы-деструкторы, является вода, а особый интерес представляют обитатели древних водоемов. Так, экосистема озера Байкал выступает важнейшей экосистемой планеты из тех, для которой вопросы биодеструкции остаются не исследованными. Примечательно, что процессы биодеструкции в экосистеме Байкала протекают при низких положительных температурах в условиях высокого содержания кислорода. Другой интересной особенностью является развитие беспозвоночных организмов в озере. Так, фауна озера Байкал на 80% представлена уникальными эндемичными организмами [3]. Большой интерес представляют байкальские эндемичные амфиподы, большинство из которых являются детритофагами и фитофагами. Это говорит о том, что данные беспозвоночные могут обладать уникальными микробными сообществами, присутствующими в желудочно-кишечном тракте. Данные микроорганизмы могут выступать симбионтными и способствуют переработке пищи растительного происхождения. В состав таких микробных сообществ входят актинобактерии, которые способны не только разрушать растительные субстраты, но и синтезировать при этом различные биологически активные природные соединения. Данная особенность позволяет облегчить межвидовую конкуренцию и обеспечить себе и организму-хозяину защиту от различных патогенов. Таким образом, природные соединения, синтезируемые актинобактериями при культивировании на трудноразлагаемых субстратах, обладают огромным биотехнологическим потенциалом и могут использоваться в биофармацевтике [4].

В связи с вышеперечисленным, целью исследования являлась оценка биотехнологического потенциала байкальских актинобактерий рода *Streptomyces* при их

культивировании на питательных средах, содержащих трудноразлагаемые органические вещества и отходы лесопиления.

В ходе данного исследования был проведен пробоотбор байкальских эндемичных амфипод вида *Acanthogammarus lappaceus longispinus*, из которых, с применением классических подходов микробиологии были выделены актинобактерии. Выделенные штаммы культивировали на питательных градиентных средах, содержащих сосновые и березовые опилки. Для оценки биотехнологического потенциала полученных актинобактерий использовались методы хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и база данных природных соединений Dictionary of Natural Products.

Для культивирования и дальнейшего анализа биотехнологического потенциала был выбран штамм *Streptomyces* sp. IB2019K190-4. В ходе проводимого исследования установлено, что при культивировании на питательной среде, содержащей опилки хвойных пород, штамм *Streptomyces* sp. IB2019K190-4 способен синтезировать 12 природных соединений. Данные природные соединения не обнаружены в контрольных условиях. Высоко вероятно, что 4 из 12 природных соединений являются новыми, не зарегистрированы в базе данных DNP и, по – видимому, могут выступать как продуктами жизнедеятельности штамма, так и продуктами деградации используемых опилок.

Также, было обнаружено соединение с m/z 276,1717, идентифицированное по базе данных DNP, как NFAT 133 или 4-Гидрокси-5-[2-(3-гидрокси-1-пропенил)-4-метилфенил]-3-метил-2-гексанон, обладающее противодиабетическим потенциалом (рис. 1). Данное соединение синтезируется штаммом *Streptomyces* sp. IB2019K190-4 при культивировании в условиях содержания в питательной среде большого количества сосновых опилок.

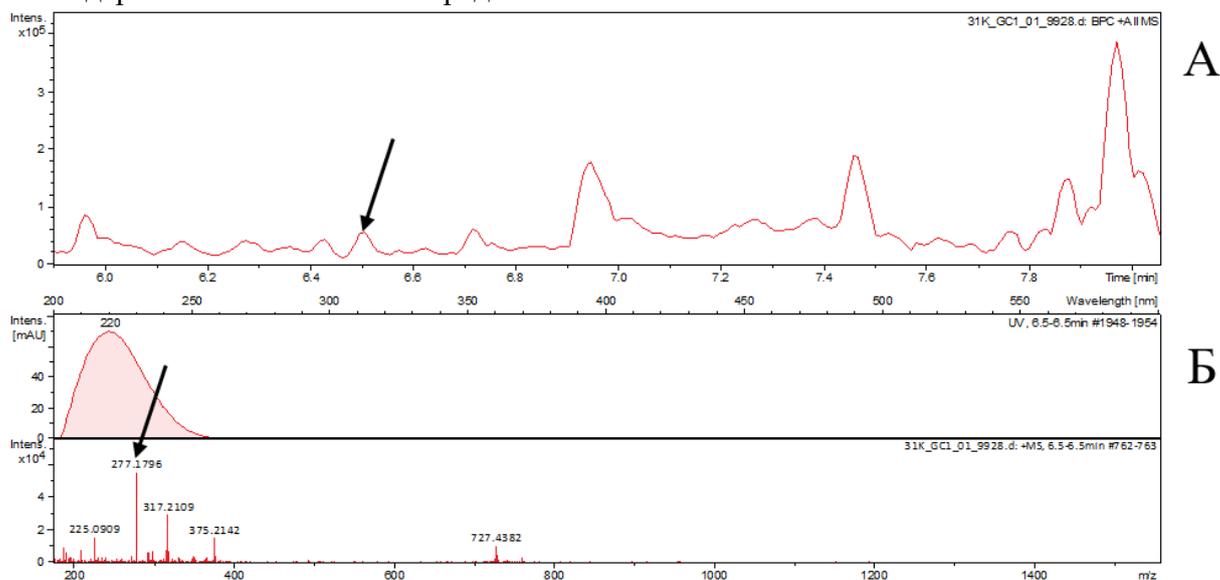


Рис. 1. Хроматограмма природного соединения, идентифицированного как NFAT 133

Примечание: А – Хроматограмма природного экстракта питательной среды ММ с высоким содержанием сосновых опилок, на которой был культивирован штамм *Streptomyces* sp. IB2019K190-4 (стрелкой отмечено соединение NFAT 133); Б – профиль масс выделенного природного соединения NFAT 133.

Вместе с тем, были проанализированы хроматограммы масс экстрактов, полученных в результате культивирования штамма *Streptomyces* sp. IB2019K190-4 на питательной среде, содержащей березовые опилки. В данных экстрактах было обнаружено 22 природных соединения, которые не были найдены при контрольных условиях культивирования. Для 12 из них совпадений и описаний в базе DNP обнаружено не было. Соединение,

синтезирующееся штаммом *Streptomyces* sp. IB2019K190-4, в условиях содержания в питательной среде сосновых опилок и идентифицированное как NFAT 133, не было обнаружено в экстрактах штамма *Streptomyces* sp. IB2019K190-4, культивированного на среде ММ, содержащей березовые опилки.

Таким образом, в ходе настоящего исследования на примере штамма *Streptomyces* sp. IB2019K190-4, показано, что отходы лесопиления могут быть использованы в качестве компонента питательных сред, необходимого для синтеза как известных, так и новых природных соединений. Примечательно при этом, что природные соединения обладают выраженной биологической активностью. Соединение, идентифицированное как NFAT 133 является тризамещенным ароматическим соединением, которое ингибирует NFAT-зависимую транскрипцию и обладает антидиабетической активностью. Таким образом, полученные известные и неизвестные соединения представляют особую ценность для современной биофармацевтики и медицины.

Исследование проведено при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (проект 18-34-00394, 18-29-05051).

Библиографический список

1. Губернаторова Т. Н. Дegrаdация стойкого органического вещества в водных экосистемах под действием микроорганизмов / Т. Н. Губернаторова, М. И. Дину // Вестник Тюменского государственного университета. – 2015. – № 2. – С. 31–38.
2. Саловарова В. П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов / В. П. Саловарова, Ю. П. Козлов. – М.: Издательский дом «Энергия», 2007. – 544 с.
3. Тимошкин О.А. К вопросу о важности изучения мелководной зоны Байкала. В кн.: Аннотированный список фаун озера Байкал и его водосборного бассейна / О. А. Тимошкин – Новосибирск: Наука, 2009. – С. 705–707.
4. Amin D.H., Abdallah N.A., Abolmaaty A., Tolba S., Wellington E.M.H. Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective // Bulletin of the National Research Centre. – 2020. – V. 44. № 5. – P. 1-12.
5. Chauhan P. S. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review / P. S. Chauhan // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2020. – V. 23. – P. 1–19.
6. Katsuhiko F., Masataka S., Youhei F., Shun M., Youji M., Yuya E. *Streptomyces abietis* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from soil of a pine forest // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – V. 63. №12. – P. 4754–4759.
7. Kulikova N. A., Kleina O. I., Stepanovaa E. V., Koroleva O. V. Use of basidiomycetes in the technology of processing and utilization of man-made waste: fundamental and applied aspects // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2011. – V. 47. № 6. – P. 619–634.
8. Sakoda S., Aisu K., Imagami H., Matsuda Y. Comparison of actinomycete community composition on the surface and inside of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) tree roots colonized by the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* // Microbial Ecology. – 2018. – V. 77. – P. 370–379.
9. Sebnem K. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes / K. Sebnem // Journal of Bioresource Technology. – 2010. – V. 101. – P. 3164–3169.
10. Thakkar C.S., Kate A.S., Desai D.C., Ghosh A.R., Kulkarni-Almeida A.A. NFAT-133 increases glucose uptake in L6 myotubes by activating AMPK pathway // European Journal of Pharmacology. – 2015. – V. 769. – №15. – P. 117–126.

ЛИШАЙНИКИ ПРОЕКТИРУЕМОЙ ООПТ «СЕРЕБРЯНСКИЙ ПАРК» ГОРОДА ПЕРМИ

Печенкина К.О.^{1,2}, Щипанова Е.А.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет

Ключевые слова: лишайники, лишенофлора, эпифиты.

ВВЕДЕНИЕ

Городские парки являются интересными объектами для лишенологических исследований, так как часто представляют собой искусственно созданные фитоценозы, в которых за время их существования сложился характерный комплекс видов лишайников. Парк расположен на месте «мичуринских садов», которые основал известный пермский озеленитель Валентин Миндовский. Территория входит в проект по благоустройству, как «Серебрянский парк у р. Данилихи» и в будущем парку планируется присвоение статуса ООПТ.

Целью работы является выявление таксономического биоразнообразия лишайников на территории Серебрянского парка, как первый этап для организации мониторинга состояния экосистем.

Задачи:

1. Сбор образцов лишайников с учетом охвата наибольшего разнообразия их местообитаний;
2. Видовая идентификация собранных образцов;
3. Проведение таксономического, биоморфологического и эколого-субстратного анализов.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Изучение лишенофлоры в черте города Перми имеет длительную историю. Первые сведения о лишайниках известны по работам П.Н. Крылова [6] и А.Н. Окснера [8, 10]. В начале 80-х годов XIX столетия в окрестностях Перми Крыловым было отмечено 37 видов. Окснер, исследуя окраины города в 1926 г., обнаружил 38 видов, из которых 27 не были указаны Крыловым.

Начало более детального и целенаправленного изучения лишенофлоры Перми было положено Л. В. Гагариной. В её работах [2; 3], приведены результаты изучения биоразнообразия эпифитных лишайников. По результатам сравнения с лишенофлорой вне города, она выявила толерантные к загрязнению виды: *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.), *Parmelia sulcata* Taylor., *Scoliosporum clorococcum* (Stenh.) Vezda., *Physcia stellaris* (L.) Nyl. Кроме того, автор отмечает снижение биоразнообразия и обилия лишайников в городских условиях.

В следующей работе Л. В. Гагарина [5] отмечает, что в условиях города слоевища имеют нарушения в развитии соредий, наблюдается существенное изменение длины лопастей. На основании этих выводов автор относит свыше 80 % слоевищ к 1-му и 2 –му классам жизненности. Помимо этого, в публикации обосновывается возможность использования такой характеристики, как диаметр слоевища в качестве показателя угнетения лишайников для изучения влияния городской среды, оценки чистоты воздуха.

Позднее лишенофлористическими исследованиями был охвачен целый ряд городов Пермского края (Чердынь, Пермь, Кунгур) и прилегающих к ним пригородных лесов [4]. В

результате установлено высокое сходство видового состава лишайников, что авторы объясняют наличием в них общего ядра адаптированных к городским условиям видов и расположением городов в пределах одной климатической зоны. Для территории Перми отмечается 106 видов лишайников. Исследователи так же выделили характерные особенности лишайников урбанизированных территорий: снижение избирательности к субстрату, усиление роли эвритоных видов, уменьшение размеров и изменение анатомической структуры талломов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основой для данной статьи послужил материал, собранный на территории парка в полевой сезон 2020 года. Сбор образцов проводился маршрутным методом. Всего было собрано порядка 50 образцов. При прокладке маршрутов учитывалось максимальное разнообразие биотопов. Географические координаты мест сбора определяли с помощью спутникового навигатора GPS/ГЛОНАС (система координат WGS-84). Камеральная обработка образцов проводилась в лаборатории биоразнообразия растений и лишайников кафедре биологии и географии ПГГПУ. Обработка материала заключалась в видовой идентификации видов согласно общепринятым методикам [1, 9], внесении информации в базу данных, инсерации образцов в гербарий, анализе списка видов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основу древесных насаждений парка составляют следующие породы: *Acer negundo* L., *Acer platanoides* L., *Tilia cordata* L., *Ulmus glabra* Huds., *Ulmus laevis* Pall. Из мелколиственных пород встречаются: *Betula pendula* Roth, *Populus tremula* L., *Populus* sp., *Sorbus aucuparia* L., *Salix alba* L., *Alnus incana* (L.) Moench, из кустарников – *Crataegus* sp., *Viburnum opulus* L., *Sambucus sibirica* Nakai, *Amelanchier ovalis* Medik. В небольшом количестве в парке произрастают интродуцированные деревья и кустарники: *Padus maackii* (Rupr.) Kom., *Symphoricarpos rivularis* Suksdorf, *Phellodendron amurense* Rupr., *Castanea* sp. На территории парка сохранились фруктовые сады с *Malus domestica* Borkn.

В ходе исследования на территории парка обнаружено 42 вида лишайников, относящихся к одному отделу *Ascomycota*, 4 классам (*Candelariomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Lecanoromycetes*), 5 подклассам, 9 порядкам, 15 семействам, 29 родам (включая роды с неясным систематическим положением). Большинство видов принадлежит классу *Lecanoromycetes* – 37 видов, что составляет 88%. В тексте статьи номенклатура видов приведена по работе R. Santesson et al. [7]

Наиболее распространенными и часто встречающимися являются следующие виды лишайников: *Parmelia sulcata* Taylor., *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.), *Physcia stellaris* (L.) Nyl. *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr., *Psilolechia lucida* (Ach.) M. Choisy, *Physcia adscendens* H. Olivier, Moberg, *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.

В спектре жизненных форм лишайников парка преобладают накипные виды (22 вида, 52,4% от общего числа) (табл. 1). Группа листоватых биоморф составляет 17 видов (40,5%). Кустистые лишайники – самая чувствительная группа к загрязнению, поэтому на территории города они представлены наименьшим числом видов (3 вида, 7,1%). Кустистые лишайники представлены 2 родами: *Cladonia* и *Evernia*.

Для большинства видов лишайников характер и свойства субстрата являются главными условиями их существования. Эколого-субстратный анализ списка видов, как и следовало ожидать, показал преобладание эпифитов – 31, что составляет 73,8% от всей флоры (табл. 2). Второе место занимают эпилиты – 8 видов (19%). Присутствие эпилитных лишайников в бореальных сообществах объясняется наличием на территории разрушенных

бетонных построек и столбов, стоящих близ железнодорожного полотна. Эпигеиды представлены наименьшим числом видов – 3 (7,2%).

Таблица 1

Жизненные формы			
№	Жизненные формы	Число видов	Доля от общего числа видов (%)
1	Накипные	22	52,4
2	Листоватые	17	40,5
3	Кустистые	3	7,1
	Всего	42	100

Таблица 2

Экологические группы			
№	Экологическая группа	Число видов	Доля от общего числа видов (%)
1	Эпифиты	31	73,8
2	Эпилиты	8	19
3	Эпигеиды	3	7,2
	Всего	42	100

Распределение лишайников по основным древесно-кустарниковым породам в парках представлено в таблице 3

Таблица 3

Распределение лишайников по древесно-кустарниковым породам												
Береза	Акация	Бузина	Сирень	Клен амер.	Боярышник	Яблоня	Ива	Тополь	Вишня	Липа	Клен плат.	Черемуха
7	3	1	3	12	6	3	5	8	6	1	2	3

Лишайники-эпифиты распределены по древесно-кустарниковым породам неравномерно. Наибольшим видовым богатством характеризуется породы, составляющие основу паркового насаждения: клен американский, тополь, береза.

На стволах малочисленных в парках пород (боярышник, черемуха, вишня, яблоня) произрастают широко распространенные виды лишайников.

В целом лишенофлора парка не отличается значительным видовым богатством в силу антропогенной нагрузки и относится к слабо нарушенным сообществам.

Библиографический список

1. Гагарина Л.В. Использование эпифитных лишайников в системе биоиндикации атмосферного воздуха в г. Перми // Экология: проблемы и пути решения. – Пермь, 2002. – С. 29-30.

2. Гагарина Л.В. Распространение и экология эпифитных лишайников г. Перми // Экология: проблемы и пути решения. Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Пермь, 2004. – С. 32-35.

3. Гагарина Л.В., Шкараба Е.М. Биоразнообразие и экология лишайников урбанизированных территорий // Фундамент и приклад. исследования в биологии и экологии: Материалы регион.науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. – Пермь, 2007. – С. 192–194.

4. Гагарина Л.В., Шкараба Е.М. Многообразие и особенности распространения лишайников г. Перми // Флора Урала в пределах бывшей Пермской губернии и ее охрана: материалы межрегион. конф., посвященной 140-летию со дня рождения П. В. Сюзева. – Пермь, 2007. – С. 13–16.

5. Крылов П.Н. Материалы к флоре Пермской губернии. Вып. III.// Тр. общ-ва естествоиспытателей при Императорском Казанском Университете. – Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1882.– Т. VI. Вып. 5. – С. 1-41.

6. Окснер А.Н. Материалы для лишенофлоры Урала и прилежащих областей / А. М. Окснер // Ботан. журн. АН УССР, 1945. – Т. 2, № 3-4. – С. 217-247.

7. Окснер А.Н. Родина Cladoniaceae лишенофлоры Приуралья. – Науч. зап./Киевского державного ун-ту, 1948. – Т.7. – Вып.6. – С.19-39.

8. Окснер А.Н. Определитель лишайников СССР // Морфология, систематика и географическое распространение. – 1974. – Вып. 2. – С. 234.

9. Флора лишайников России: Биология, экология, разнообразие, распространение и методы изучения лишайников. / Под. ред. М.П. Андреев, Д.Е. Гимельбрант. – М; СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – С 392.

10. Nordin A. et al. Santesson's Checklist of Fennoscandian Lichen-forming and Lichenicolous Fungi, [Электронный ресурс]. 2011. URL: <http://130.238.83.220/santesson/home.php>. (дата обращения: 01.09.2020).

УСТОЙЧИВОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS* К ВОЗДЕЙСТВИЮ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

Писцова О. Н.¹, Куюкина М. С.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

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

Ключевые слова: родококки, наночастицы, диоксид кремния, устойчивость, концентрационная зависимость.

Наноматериалы определяются как природные, переходные или инженерные материалы, содержащие частицы в несвязанном или агрегатном состоянии, $\geq 50\%$ которых находится в размерном диапазоне одного или более пространственных разрешений от 1 до 100 нм [1]. Материалы размером до 100 нм имеют уникальные свойства, основанные на квантовой механике, более чем на макроскопической Ньютоновой механике, которая воздействует на такие свойства материала как проводимость, теплопроводность, температура плавления, оптические свойства и магнетизм [2]. Распространенность определенных типов наноминералов, называемых глинами и представляющих собой минеральные коллоиды, была известна давно. В настоящее время установлено, что минеральные наночастицы могут оказывать влияние на ключевые геохимические и биогеохимические реакции [3]. Кремний – это второй наиболее распространенный элемент в Земной коре после кислорода, составляющий примерно 27,6% от общей массы элементов [4]. Недавно большой интерес привлекло потенциальное воздействие наночастиц диоксида кремния на состояние почвенных биоценозов [5]. Микроорганизмы играют важную роль в стабилизации здоровья почв, функций экосистем и их продуктивности. Углеродородокисляющие микроорганизмы являются частью гетеротрофного сообщества и присутствуют как в загрязненных, так и в незагрязненных экосистемах. При этом для

хронически загрязненных экосистем безусловными доминантами являются представители рода *Rhodococcus* [6].

Целью работы было исследование влияния наночастиц оксида кремния на жизнеспособность коллекционных культур родококков, принадлежащих к разным видам.

В работе использовали 24 штамма, принадлежащих к 5 видам: *R. erythropolis* (5 штаммов), *R. fascians* (5 штаммов), *R. opacus* (4 штамма), *R. rhodochrous* (5 штаммов) и *R. ruber* (5 штаммов), из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM # 768; www.iegm.ru/iegmcol). Культуры выделены из различных водных и почвенных источников. Использовали коммерческие суспензии наночастиц оксида кремния (НЧ SiO₂), стабилизированные β-циклодекстрином или арабиногалактаном (М9, Россия). Инкубирование бактерий в присутствии различных концентраций НЧ SiO₂ проводили в минеральной среде RS следующего состава (г/л): KH₂PO₄ – 2,0, K₂HPO₄ – 2,0, KNO₃ – 1,0, (NH₄)₂SO₄ – 2,0, NaCl – 1,0, MgSO₄ x 7H₂O – 0,2, CaCl₂ x 2H₂O – 0,02, FeCl₃ x 7H₂O – 0,001. Жизнеспособность клеток оценивали микролуночным методом с помощью селективного окрашивания 0,2 масс. % водным раствором йодонитротеразолия хлорида (ИНТХ) (Sigma-Aldrich, США). Для этого в 96-луночные микропланшеты (Медполимер, Санкт-Петербург) вносили 50 мкл суспензии клеток в среде RS и добавляли суспензию наночастиц со стабилизатором циклодекстрин/арабиногалактан в концентрациях: 0,05; 0,5; 5 и 50 мг/л и инкубировали при 28°C, 600 об./мин в течение 24 ч на микропланшетном шейкере-инкубаторе Titramax 1000 (Heidolf-Instruments, Германия). Затем вносили 50 мкл ИНТХ и через сутки измеряли ОП_{630нм} окрашенной ИНТХ суспензии на микропланшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия) с программным обеспечением Ascent Software v.2.6 (Thermo Labsystems, Финляндия). Жизнеспособность клеток (в %) рассчитывали по разнице ОП_{630нм} с контрольной (без внесения наночастиц) суспензией. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, США). Рассчитывали среднее арифметическое, стандартное отклонение, достоверность различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента.

По нашим данным (рис. 1), исследованные штаммы по степени жизнеспособности клеток после инкубации с НЧ SiO₂ подразделялись на три группы: устойчивые (выживаемость – 100%), чувствительные (60-80%) и стимулируемые (120%). К устойчивым относились представители видов *R. opacus* и *R. rhodochrous*, к чувствительным – *R. erythropolis* и *R. ruber*, а к стимулируемым – *R. fascians*. При этом для чувствительных видов были характерны максимальные различия средних данных (до 60%), тогда как штаммы видов с наибольшей выживаемостью отличались высокой гомогенностью (20%) исследуемого признака. Концентрационная зависимость токсического воздействия НЧ SiO₂ проявлялась наиболее четко в отношении представителей *R. opacus*, для которых при максимальной концентрации (50 мг/л) выявлено 10%-ное снижение жизнеспособности. В то же время, для стимулируемых *R. fascians* и устойчивых *R. rhodochrous* отмечалось незначительное повышение жизнеспособности клеток при воздействии максимальной концентрации НЧ SiO₂. Интересно отметить наличие характерных пиков показателя жизнеспособности *R. fascians*, *R. erythropolis* и *R. ruber* в присутствии 5 мг/л НЧ SiO₂, по-видимому обусловленных стрессорной реакцией бактериальных клеток на воздействие субингибиторной концентрации наночастиц. В литературе имеются противоречивые данные по жизнеспособности бактерий после инкубации с наночастицами кремния в результате как нейтрального действия, так и стимулирования и значительного ингибирования бактериального роста, однако механизмы различной реакции

микроорганизмов на воздействие наноминералов до конца не выяснены [5, 7, 8].

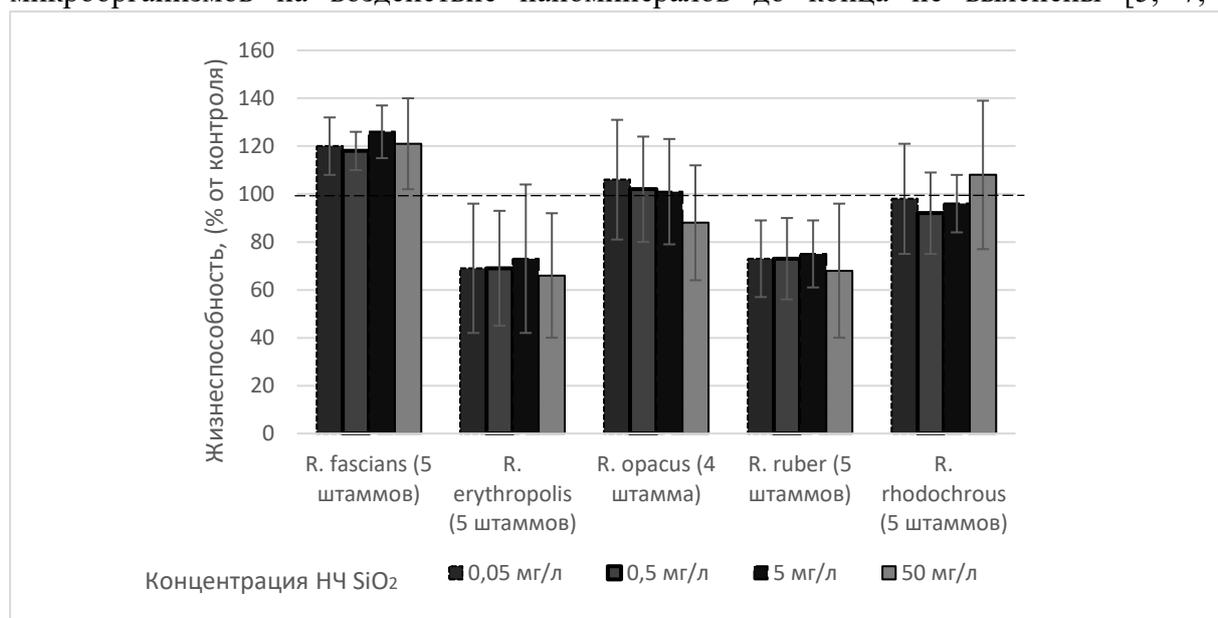


Рис. 1. Степень жизнеспособности представителей *Rhodococcus* spp. после взаимодействия с наночастицами диоксида кремния.

Далее нами было изучено влияние стабилизатора на токсическое воздействие НЧ SiO₂ в отношении родококков. Как видно из табл. 1, достоверных различий показателей жизнеспособности родококков при использовании двух разных стабилизаторов не выявлено, хотя при максимальной (50 мг/л) концентрации НЧ SiO₂ клетки разных штаммов одного вида по-разному реагировали на присутствие стабилизатора: β-циклодекстрин повышал устойчивость 3 из 5 исследуемых культур *R. ruber*, тогда как арабиногалактан существенно повышал устойчивость к НЧ SiO₂ клеток лишь одного штамма – *R. ruber* ИЭГМ 236. Таким образом, токсическое воздействие наночастиц диоксида кремния не зависело от используемого стабилизатора.

Таблица 1

Сравнительная жизнеспособность (в % к контролю) представителей *R. ruber* при воздействии наночастиц диоксида кремния в различных стабилизаторах

Вид, штамм	Концентрация НЧ SiO ₂ (мг/л)			
	0,05	0,5	5	50
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231	92±11	92±6	94±7	83±7
	83±13	84±11	93±9	96±4
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 219	72±5	63±3	66±6	58±4
	77±8	66±6	72±7	44±7
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 235	74±11	70±5	64±7	105±1*
	53±11	57±8	61±15	68±6
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 236	57±5	60±5	64±8	11±7*
	48±4	47±4	58±3	61±3
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 243	81±11	98±10	82±9	95±11*
	92±15	91±15	90±18	58±14

Примечание. В числителе и знаменателе приведены данные для β-циклодекстрина и арабиногалактана соответственно. *Достоверны различия средних данных.

Сравнительная динамика показателя жизнеспособности клеток отдельных представителей родококков под влиянием различных концентраций НЧ SiO₂ приведена на рис. 2. Как видно из рис. 2, для штаммов одного вида была характерна различная динамика устойчивости к наночастицам. Так при повышении концентрации НЧ SiO₂ от 0,05 до 5,0 мг/л регистрировалось увеличение количества жизнеспособных клеток 3 из 5 исследованных штаммов *R. fascians*, а при дальнейшем повышении концентрации наночастиц до максимального (50 мг/л) значения наблюдалось резкое падение жизнеспособности двух штаммов данного вида, аналогичное таковому *R. fascians* ИЭГМ 173 при более низкой (0,5 мг/л) концентрации, что, возможно, говорит о разноплановых изменениях проницаемости клеточной стенки бактерий. Характерно, что инкубирование представителей *R. fascians* в присутствии повышенной (50 мг/л) концентрации НЧ SiO₂ приводило в одном случае к резкому снижению, а в другом – к увеличению показателя жизнеспособности клеток, свидетельствуя об ингибировании одних и стимулировании роста других представителей данного вида родококков. Аналогичные разноплановые изменения жизнеспособности клеток под действием НЧ SiO₂ наблюдались и для других, в целом чувствительных либо устойчивых видов *Rhodococcus*.

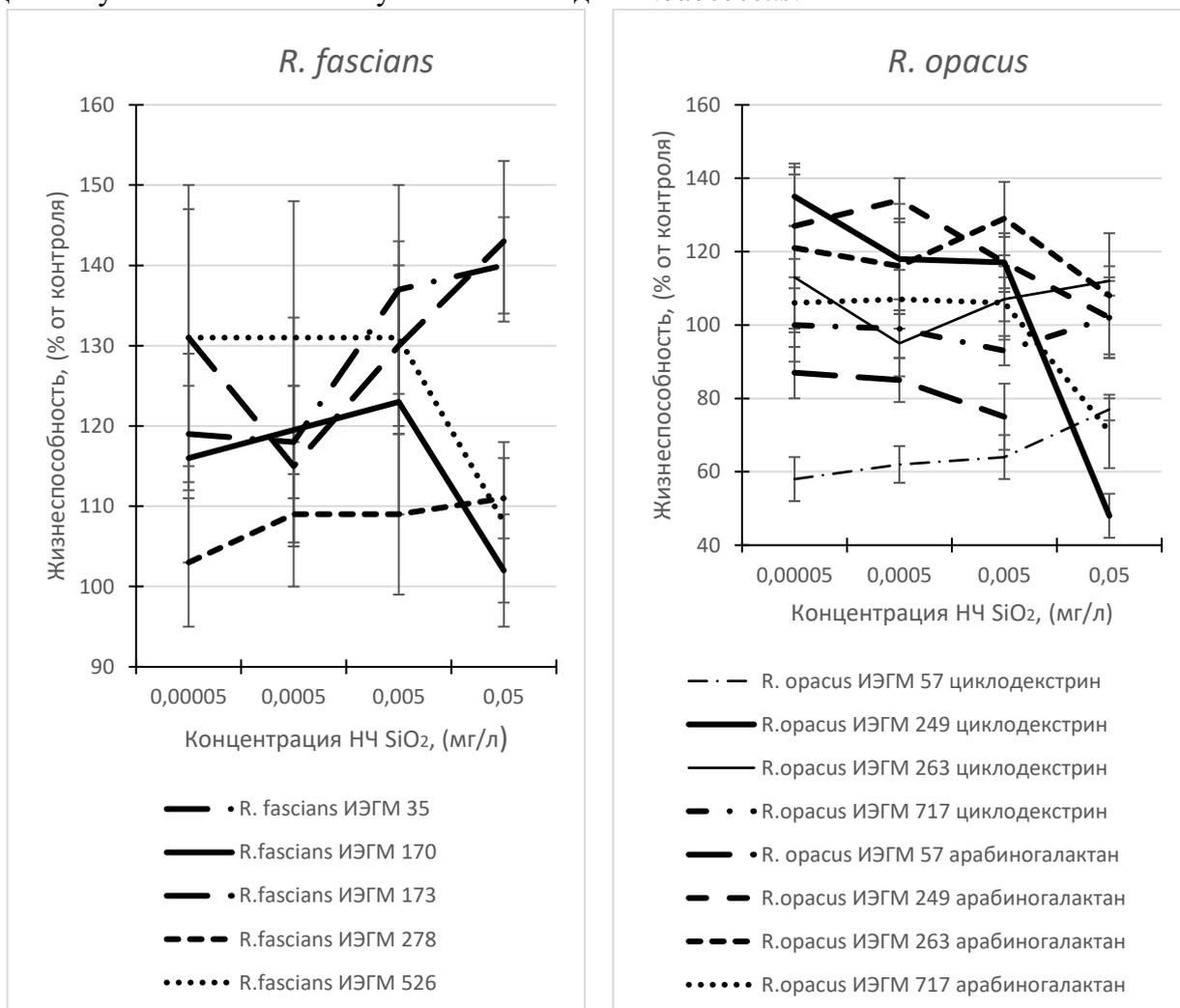


Рис. 2. Сравнительная динамика показателя жизнеспособности клеток родококков под влиянием различных концентраций наночастиц диоксида кремния.

Выявленные видовые и штаммовые различия в устойчивости родококков к наночастицам диоксида кремния послужат лучшему пониманию роли нанохимической

составляющей почвы в функционировании почвенного бактериоценоза, а также могут быть использованы при отборе устойчивых к наночастицам штаммов для экобиотехнологического применения [8].

Исследования выполнены в рамках госзаданий Минобрнауки РФ (AAAA-A19-119112290008-4 и FSNF-2020-0008) и поддержаны грантом МИГ в рамках региональной конкурсной программы Министерства образования Пермского края (Соглашение № С-26/174.1).

Библиографический список

1. Kabir E., Kumar V., Kim K., Yip A., Sohn., J. R. Environmental impacts of nanomaterials // *Journal of Environmental Management*. 2018. V. 225: P. 261-271.
2. Rana S., Kalaichelvan P. T. Ecotoxicity of nanoparticles // *ISRN Toxicology*. 2013. V. 11: P. 1-9.
3. Hochella M., Lower S., Maurice P., Penn R., Sahai N., Sparks D., Twining B. Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems // *Science*. 2008. V. 319: P.1631-1634.
4. Shah V., Belozeroва I. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds // *Water Air Soil Pollut*. 2008. V. 197: P. 143-148.
5. Tereshchenko N., Zmeeva O., Makarov B., Kravets A., Svetlichny V., Lapin I., Zoticova A., Petrova L., Yunusova T. The influence of silicon oxide nanoparticles on morphometric parameters of monocotyledons and dicotyledons in soil as on microbiological soil properties // *BioNanoSci*. 2017. P 1-9.
6. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // In: *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications*, editor I. Kurtböke, Elsevier. 2017. P. 121–148.
7. Dyshlyuk L., Babich O., Ivanova S., Vasilchenko N., Atuchin V., Korolkov I., Russacov D., Prosekov A. Antimicrobial potential of ZnO, TiO₂ and SiO₂ nanoparticles in protecting building materials from biodegradation // *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2020. V. 146: P 1-8.
8. Zheng X., Su Y., Chen Y. Acute and chronic responses of activated sludge viability and performance to silica nanoparticles // *Environmental Science and Technology*. 2012. V. 46: P. 7182-7188.

ФЕНОЛОГИЯ *ALLOMENGEA SCOPIGERA* (GRUBE, 1859) ГОСУДАРСТВЕННОГО ЗАПОВЕДНИКА «БАСЕГИ»

Плакхина Е.В.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: пауки-линифииды, сезонная активность, Средний Урал

Пауки (Aranei) одна из наиболее распространенных групп беспозвоночных, составляющая важнейший компонент биоценозов. Не вызывает сомнения, что пауки играют огромную роль в качестве регуляторов численности насекомых-вредителей. Некоторые из них, используя паутину, способны уничтожить количество насекомых в 50 раз превышающее их пищевые потребности [15].

Жизненные циклы этой обширной группы уже много десятилетий активно изучаются за рубежом [13,10, 14, 9, 11, 12]. Тогда как в России до сих пор не так много работ посвящено этой тематике [2, 3, 8, 6, 5, 4]. В то время как важность знания жизненных циклов для

определения места пауков в экосистемах и их роли в них остается несомненной. Одним из существенных компонентов жизненного цикла организма является его активность в течении сезона, которую изучает фенология.

В связи с этим целью данной работы стало выявление фенологии одного из массовых видов пауков *Allomengea scopigera* (Grube, 1859), а также сравнительный анализ жизненных циклов вида в зависимости от биотопа.

Материалы для данной публикации получены в результате изучения аранеофауны государственного заповедника «Басеги» в период с 1984 по 1996 г. Материал собирался при помощи почвенных ловушек Барбера. Ловушки экспонировались по 10 дней. В 1984 году материал собирался в период со второй декады июля (24 июня) по первую декаду сентября (9 сентября). В 1985 году с первой декады июня (3 июня) по вторую декаду августа (16 августа). В 1986 году с третьей декады июня (21 июня) по вторую декаду августа (12 августа). В 1990 году в период с первой декады июля (3 июля) по вторую декаду сентября (19 сентября).

Фенологические сезоны в заповеднике были выделены согласно «Календарю природы Свердловска и его окрестностей» В.А.Батманова [1], далее в тексте и на рисунках римскими цифрами указаны обозначения следующие фенологические сезоны: I – зеленая весна (11.05 - 23.05), II – предлетье (24.05 - 10.06), III – раннее лето (11.06 - 27.06), IV – полное лето (28.06 - 25.07), V – спад лета (26.07 - 16.08), VI – ранняя осень (17.08 - 09.09), VII – золотая осень (10.09 - 30.09).

Всего за период исследований на территории государственного заповедника «Басеги» было собрано 3078 особей *A. scopigera*, из которых 66,2 % представлено половозрелыми особями. Статистическая обработка результатов исследования проводилась средствами MS Excel.

Анализ собранного материала показал, что распределение *A. scopigera* неравномерное. Так, наименьшее количество особей, единичные экземпляры, было отмечено на болоте сфагновом, в криволесье елово-березовом, в березняке заболоченном, редколесье березовом и в тундре кустарничково-мохово-горцовой. Эти биотопы хоть и характеризуются достаточно хорошей прогреваемостью, однако в некоторых присутствует повышенная влажность, в других недостаточно развит травяно-кустарничковый ярус, создающий возможности для расселения исследуемого вида. Кроме того, некоторые из этих биотопов характеризуются слабым накоплением листовного опада.

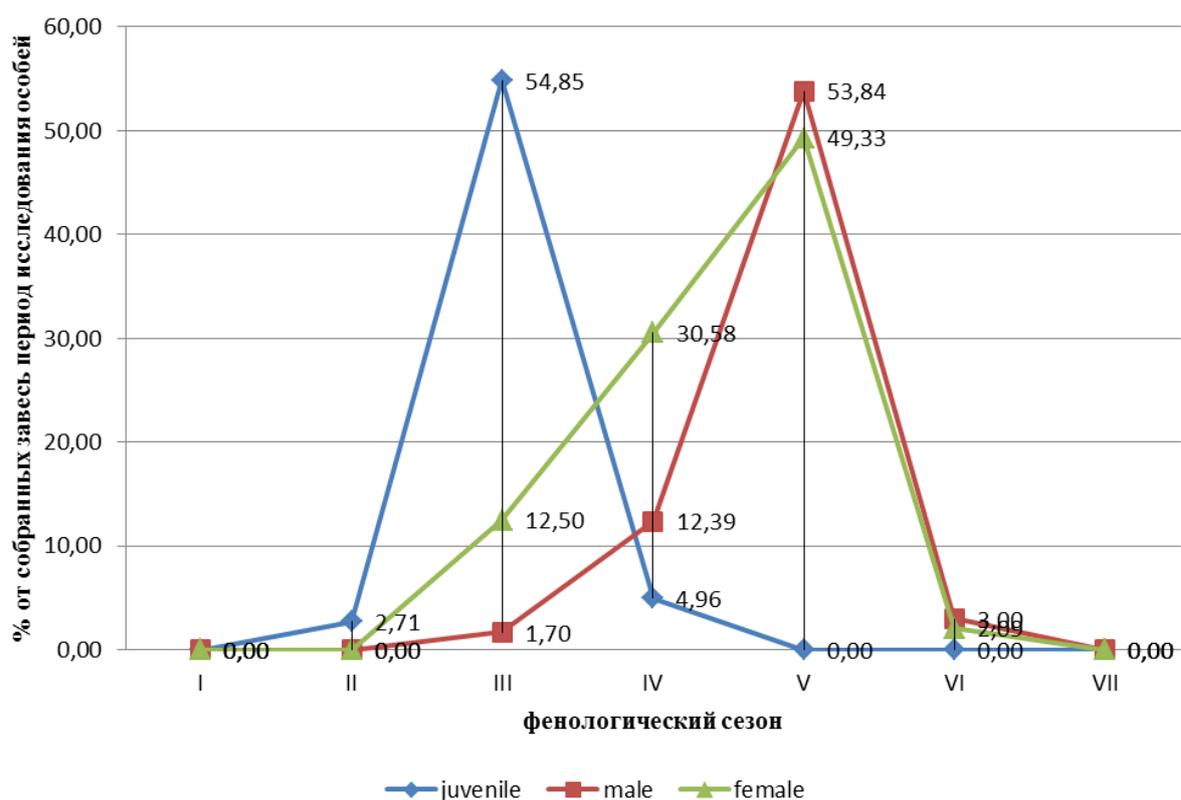
Наибольшее количество экземпляров *A. scopigera*, собранных за весь исследуемый период, нами зафиксировано в лесных биотопах, а именно: в лесу папоротниково-горцовом, в лесу папоротниково-хвощевом, лесу папоротниковом и в лесу приручейно-крупнотравном таволгово-чемеричном. В папоротниково-горцовом и папоротниково-хвощевом лесах разница в численности особей, отмеченной нами, была не значительной. В то время как в лесу папоротниковом и в лесу приручейно-крупнотравном таволгово-чемеричном, зафиксированная численность особей существенно ниже по сравнению с папоротниково-горцовым и папоротниково-хвощевым лесами, в 2 и, даже, 6 раз, соответственно.

Согласно нашим исследованиям впервые ювенильные особи *A. scopigera* в лесных биотопах появляются ранним летом (III). На этот же фенологический сезон приходится их пик численности. Самки *A. scopigera* в исследованных лесных биотопах и на пустыре купыревом появляются в полное лето (IV). Пик их численности в лесных биотопах мы наблюдали в спад лета (V), за исключением папоротниково-хвощевого леса, в котором пик численности самок сместился в сторону полного лета (IV). Самцы в лесных биотопах

впервые появляются полным летом (IV), пик их численности, как и у самок, приходится на спад лета (V).

На лугах же картина меняется. На лугу разнотравном с ивняком ювенильные особи впервые отмечены в предлетье (II), а их пик численности приходится на полное лето (IV), однако численность отличается от предыдущего сезона (III) настолько несущественно, что, можно сказать, образует плато в летние фенологические сезоны. Первые самки появляются на лугах ранним летом (III), а пик их численности пришелся на спад лета (V). А вот на лугу разнотравном с ивняком половозрелых самок, как и самцов, не было отмечено вовсе. Смещение выхода самок в сторону спада лета на лугу разнотравном-крупнозлаковым, скорее всего объясняется в целом более низкой температурой окружающей среды по сравнению с другими лугами. Луг же разнотравный-крупнозлаковый подгольцовый находится ниже всех прочих лугов относительно склона горы Северный Басег, более комфортные температурные условия этого луга объясняют более ранний выход половозрелых самок, в период полного лета (IV). Самцы на лугах впервые попадались в ловушки ранним летом (III), пик их численности приходился на полное лето (IV), последние особи попадались в ловушки ранней осенью (VI).

Попадаемость *A. scopigera* в ловушки на территории государственного заповедника "Басеги"



Обобщенные данные по фенологии *A. scopigera* в заповеднике Басеги представлены на рис. Из графика видно, что ювенильные особи впервые появляются в период предлетья (II), они и являются первыми отмеченными представителями данного вида. Пик численности неполовозрелых особей приходится на раннее лето (III). В это же время в ловушки начинают попадать единичные представители самок и самцов. Число их неуклонно растет в течении полного лета (IV), в то время как численность ювенильных особей в этот сезон резко снижается. Позднее неполовозрелые особи в нашем исследовании не представлены. Пик численности как самок, так и самцов *A. scopigera* приходится на

спад лета (V). В период ранней осени (VII) встречаются единичные экземпляры самок и самцов. Таким образом, согласно фенологической периодизации *A. scorigera* может считаться «летним» представителем аранеофауны Государственного заповедника «Басеги».

Пользуясь случаем выражаю благодарность С.Л. Есюнину за предоставленную информацию о пауках заповедника.

Библиографический список

1. Батманов В.А. Календарь природы Свердловска и его окрестностей. - Свердловск, Свердл. обл. гос. изд., 1952 98с.

2. Волковский Е.В.. Динамика численности и фенология пауков *Araneus diadematus* (Clerck, 1757) (Aranei, Araneidae) различных биотопов Алтайского региона // Вестник Красноярского государственного педагогического университета им. В.П. Астафьева. – 2012.- № 2. – С/ 394-398/

3. Волковский Е.В. Динамика численности и фенология пауков *Alopecosa accentuate* (Latreille, 1817) (Aranei, Araneidae) лесных биотопов Алтайского региона// Перспективы науки. - 2012. - № 29. - С. 15-20.

4. Есюнин С.Л., Коробейников Ю.И. Фенология пауков-волков (Aranei, Lycosidae) на Южном Ямале // Зоологический журнал. - 1990. - Т. 69. - № 8. - С. 42.

5. Ковблюк Н.М Пауки рода *Drassodes* (Aranei, Gnaphosidae) фауны Крыма// Вестник зоологии. - 2008. - Т. 42. - № 1. С. 11-24.

6. Лобанова Т.В. Пауки-волки (Aranei, Lycosidae) Западной Сибири. Автореф. дис. канд. биол. наук. - Новосибирск, 1977. - 23с.

7. Олигер Т.И. Пауки (Aranei) на снегу в Юго-Восточном Приладожье// Евразийский энтомологический журнал. - 2003. - Т. 2. - № 4. - С. 251-259.

8. Триликаускас Л.А. Жизненные циклы и динамика некоторых видов пауков-волков (Aranei, Lycosidae) в верховьях р. Буреи (Хабаровский край). // Евразийский энтомологический журнал. - 2007. - Т. 6. - № 4. - С. 365-372.

9. Buddle, C.M., Draney, M.L. Phenology of linyphiids in an old-growth deciduous forest in central Alberta, Canada// Journal of Arachnology. – 2004. - № 32 (2). -p. 221-230 11.

10. Florencia F. C. Cross-habitat variation in the phenology of a colonial spider:insights from a reciprocal transplant study // Naturwissenschaften. – 2010. - № 97. – p. 279–289.

11. Haouge, E. Spider (Araneae) from square samples and pitfall traps in coastal heathland, Western Norway. Habitat preference, phenology and distribution//Fauna Norvegica – 2000. - № 20. - p. 31-42.

12. Kesmezoglu, S., Varol, I., Yagmur, E.A., Kutuk, M., Ozaslan, M. The phenological records on *Eresus cinnabarinus* (Olivier, 1789) (Araneae: Eresidae)// Journal of Biological Sciences/ / 2006/ - № 6 (3). - p. 631-63.

13. Marshall, S.D., Pavuk, D.M., Rypstra, A.L. A comparative study of phenology and daily activity patterns in the wolf spiders *Pardosa milvina* and *Hogna helluo* in soybean agroecosystems in southwestern Ohio (Araneae, Lycosidae)// Journal of Arachnology. – 2002. - №30 (3).- p. 503-510.

14. Miliczky, E.R., Horton, D.R., Calkins, C.O. Observations on phenology and overwintering of spiders associated with apple and pear orchards in south-central Washington. // Journal of Arachnology. – 2008. -№ 36 (3). - p. 565-573.

15. Rietcher S.E., Lockley T. Spiders as biological control agents // Annu. Rev. Ent. - 1984. -V.29. - P. 299-320.

МУРАВЬИ КУНГУРСКОЙ ЛЕСОСТЕПИ

Поспелова А.Д.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: Formicidae, фауна, сообщества муравьев, Кунгурская лесостепь

Муравьи – общественные насекомые, играющие важную роль в наземных биоценозах в силу своей многочисленности и разнообразия. В настоящее время в фауне России насчитывается 264 вида муравьев [5]; на Урале, по данным Гридиной, - более 70 видов муравьев [1].

Кунгурская лесостепь представляет собой северный, достаточно хорошо выраженный, участок островной лесостепи, отделенный от зональной лесостепи широкой полосой хвойно-широколиственных лесов. Островные участки экосистем представляют собой особый интерес для экологических исследований, поскольку обитающие на них сообщества живых организмов обладают рядом существенных особенностей (обедненный видовой состав, часто обогащенный реликтами и т.д.). Существует целое научное направление – островная биогеография – которое нацелено на изучение таких островов и процессов, происходящих на них.

Фауна муравьев Кунгурской островной лесостепи изучена неравномерно. Наиболее изученной является участок в Кунгурском районе Пермского края. В работах Ф.А. Сеймы [3] и Т.И. Гридиной [1,2] указано 30 видов муравьев. Можно считать, что мирмекофауна данного района изучена достаточно полно, но вполне можно ожидать увеличение списка видов. Прежде всего это связано с изменениями в систематике ряда плохо изученных таксонов. Возможны также и процессы, характерные для островных участков – исчезновение одних видов и вселение других. Кроме того, в настоящее время отмечается общая трансформация экосистем, связанная с глобальными изменениями климата, что также может отразиться на населении муравьев.

Гораздо меньше литературных данных об особенностях распространения видов муравьев, об их экологических предпочтениях. Практически не изученным остаётся вопрос о разнообразии сообществ муравьев. Известно, что разные виды муравьев, обитающие на одной территории, сочетаются не случайным образом, формируя сложные, иерархически устроенные многовидовые ассоциации с тесным взаимодействием между видами. Организация сообществ муравьев таежной зоны Пермского края детально изучалась Ф.А. Сеймой [4]. В лесостепной зоне, где встречается больше видов муравьев, их сообщества могут быть разнообразнее и устроены сложнее, чем таежные.

В связи с этим нами было начато изучение биоразнообразия и структуры сообществ муравьев Кунгурской островной лесостепи.

Муравьев собирали в двух пунктах в окрестностях г. Кунгур: на ООПТ «Ледяная гора и Кунгурская ледяная пещера» (участок 1) и в 8 км к востоку от Кунгура на участке остепнённого березняка (участок 2). На первом участке была заложена линия из шести площадок, проходящая через луг и участок соснового леса. Площадки 1.1, 1.2 и 1.3 были заложены на лугу, каждая в 30 метрах друг от друга. Площадки 1.4, 1.5 и 1.6 в сосновом лесу, в местах с сильной рекреационной нагрузкой. На втором участке заложена линия из 5 площадок от поля до опушки березняка и далее вглубь леса: 2.1 - опушка березняка, 2.2 и 2.3 - берёзовый лес, 2.4 - лиственнично-берёзовый лес и 2.5 - поле возле березняка.

Сбор муравьев проводился по методу Огаты [6], который предполагает сбор всех особей муравьев в течение 30 минут при внимательном осмотре поверхности почвы, травы и стволов деревьев.

Всего на обследованных участках обнаружено 18 видов муравьев из 6 родов и 2 подсемейств:

п/сем. Myrmicinae: *Myrmica rubra*, *M. ruginodis*, *M. schencki*, *M. rugulosa*, *Leptothorax acervorum*, *Tetramorium caespitum*, *Formicoxenus nitidulus*

п/сем. Formicinae: *Formica rufa*, *F. pratensis*, *F. cunicularia*, *F. rufibarbis*, *F. fusca*, *F. exsecta*, *F. sanguinea*, *Lasius niger*, *L. alienus*, *L. longiceps*, *L. flavus*.

Это составляет 65% от списка видов Кунгурской лесостепи, приводимых разными авторами [1, 2, 3]. К. Огата [6], предлагая свой метод, отмечал, что с его помощью учитывается около 60% фауны муравьев, что очень хорошо совпадает с полученными нами результатами. При этом следует отметить, что охват территории и период исследований в работах Ф. А. Сеймы [3] и Т. И. Гридиной [1, 2] существенно больше, а использованные методики учёта - разнообразнее. Так, методом Огаты могут недоучитываться редкие, мелкие и скрытоживущие виды. Поэтому обнаружение практически всех основных видов муравьев Кунгурской лесостепи на сравнительно небольшом участке свидетельствует о высоком биоразнообразии данного района.

Изученные нами площадки существенно различались как по типу растительности, так и по степени антропогенного влияния.

На первом участке на площадке 1.1 встречается достаточно много видов муравьев из различных родов (*Tetramorium*, *Formica*, *Myrmica*, *Lasius*) благодаря богатому разнообразию растительности и, следовательно, большой кормовой базе. Данная площадка так же практически не подвергается антропогенному влиянию. Доминантом сообщества является *F. pratensis*, который является антропофобом, плохо переносящим антропогенную нагрузку вследствие низкой экологической пластичности. К тому же способ фуражировки, когда рабочие ведут самостоятельный сбор добычи и равномерно распределяются по участку, ведёт к тому, что огромное число фуражиров погибает под ногами людей. Семья хуже обеспечивается пищей и приходит к постепенной деградации.

Площадки 1.2 и 1.3 обеднены видами из-за густого растительного покрова. Они практически не подвергаются антропогенному воздействию, что способствует разрастанию ковыля, который покрывает почву плотным слоем. Растительность частично закрывает гнёзда от солнечного света, из-за чего расплод хуже прогревается и развивается гораздо медленнее. Однако, именно на этих площадках наиболее многочислен недавно описанный вид *L. longiceps*. Это геобионт, предпочитающий умеренную влажность и тенистость. Именно на этих площадках его численность заметно выше численности остальных видов сообщества.

На антропогенно нарушенных площадках (1.4, 1.5, 1.6) разнообразие видов муравьев варьирует от среднего до высокого уровня. Это связано в первую очередь с тем, что муравьи любят селиться на обочинах троп, где разреженный травяной покров и им легче передвигаться и искать пищу. Такие места хорошогреваются солнцем, что способствует более быстрому созреванию расплода. На данных площадках наиболее часто встречающиеся виды принадлежат к роду *Lasius*, *Myrmica* и подроду *Serviformica*.

На втором участке на площадке 2.1 сработал так называемый экотонный эффект, когда в переходных зонах между сообществами происходит увеличение видового разнообразия. В такое экотонное сообщество вошли как лесные виды (*F. fusca*, *M. ruginodis*), так и виды, предпочитающие открытые пространства (*L. niger*, *F. pratensis*, *F. rufibarbis*). На данной площадке антропогенная нарушенность средней степени. Некоторые

виды, например *Lasius* и *Myrmica*, легко приспосабливаются к таким условиям, извлекая из них выгоду. Например, поваленные стволы используются некоторыми видами для строительства гнезда.

Однако не все виды муравьёв хорошо переносят даже небольшую антропогенную нагрузку. Сильнее всех подвержены этому влиянию рыжие лесные муравьи, но именно они играют важную роль в защите леса от вредителей и поддержании всей лесной экосистемы. В основном муравьи страдают от механического повреждения их гнёзд, от гибели рабочих и нарушении структуры почвы вследствие вытаптывания. К тому же представители подрода *Formica* являются экологически более консервативными и хуже приспосабливаются к изменяющимся условиям среды. В частности, *F. rufa* были обнаружены лишь на площадках 2.2 и 2.3, которые наименее подвержены антропогенному влиянию. Но всё чаще берёзняк подвергается бессистемной рубке леса, что приводит к уменьшению кормовых участков рыжих лесных муравьёв и к исчезновению их привычной среды обитания.

На площадке 2.4 сообщество муравьёв резко сменяется. Начинает преобладать редко встречающийся до этого *F. sanguinea*. Это антропотолерантный вид, который может приспособиться к условиям небольшой антропогенной нагрузки. Видовое разнообразие на данной площадке среднее из-за умеренной антропогенной нагрузки (вытаптывание, кострища) и небогатого растительного покрова.

Следует так же сказать, что увеличение видового разнообразия муравьёв происходит лишь при малой и умеренной антропогенной нагрузке. При её увеличении происходит стремительное уменьшение количества видов муравьёв из-за частого разрушения гнёзд, уменьшения кормовой базы и увеличения мест, непригодных для строительства гнёзд. Так, на площадке 2.5 мирмекофауна представлена всего лишь одним видом муравьёв – *Lasius niger*. Данная местность используется для выпаса скота. В результате этого нарушается структура почвы, уничтожается растительный покров, происходит гибель рабочих особей муравьёв. В подобных условиях смог выжить лишь *L. niger*, так как муравьи данного вида неприхотливы в еде и в местах проживания, легко приспосабливаются к новым условиям, быстро расселяются на новые территории. К тому же этот вид достаточно агрессивен, в некоторых сообществах муравьёв он может играть роль доминанта. Благодаря этому *L. niger* быстро изгоняет со своей территории другие виды муравьёв.

Таким образом, антропогенная нагрузка существенно влияет на сообщества муравьёв. При слабой нагрузке может наблюдаться повышение числа видов, тогда как при сильной нагрузке заметно снижение видового разнообразия. При этом в первую очередь исчезают виды рода *Formica*, тогда как муравьи из рода *Lasius* и *Myrmica* процветают.

Библиографический список

1. Гридина Т.И. Муравьи Урала и их географическое распределение // Успехи современной биологии. - 2003. - Т. 123. - № 3. - С. 289–298.
2. Гридина Т.И. Географический анализ фауны муравьёв Пермской области // Географический вестник. - 2006. - № 1. - С. 145-148.
3. Сейма Ф. А. Муравьи центральной и южной части Пермской области // Ученые записки Пермского государственного педагогического ин-та. – Пермь. - 1969. - С. 117 – 132.
4. Сейма Ф.А. Структура населения муравьёв тайги. - Пермь: Изд-во Пермского ун-та. - 2008. – 166 с.
5. Annotated Catalogue of the Hymenoptera of Russia. Volume 1. Symphyta and Apocrita: Aculeata /S. A. Belokobylskij, A. S. Lelej (Eds.). Proceedings of the Zoological Institute RAS. - 2017. - 476 p.

6. Ogata K. Measuring biodiversity of ants (Hymenoptera: Formicidae) // XX International Congress of Entomology. – Firenze. - 1996. - P. 96.

МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ КАЛИЙНЫХ СОЛЕЙ ЯКШИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ (РЕСПУБЛИКА КОМИ)

Пьянкова А.А.¹, Шанина С.Н.², Игнатович О.О.³, Плотникова Е.Г.¹

¹*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия*

²*Институт геологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, Россия*

³*ООО «Полярноуралгеология», г. Сыктывкар, Россия*

Ключевые слова: Якшинское месторождение солей, культивируемые бактерии, ПЦР, гены 16S рРНК, секвенирование

Якшинское месторождение калийно-магниевых солей расположено в юго-западной части Верхнепечорского соленосного бассейна (Троицко-Печорский район Республики Коми), который является самым северным среди пермских соленосных бассейнов восточной части Русской платформы и Прикаспийской синеклизы. В разрезе соленосной толщи, также как и для Верхнекамского месторождения, выделяются три зоны: подстилающей каменной соли, калийно-магниевых солей и покровной каменной соли. В настоящее время на площади Якшинского месторождения ведутся опытно-промышленные работы по извлечению калийных солей (карналлита, сильвинита) методом подземного выщелачивания. Ранее было установлено, что органическое вещество соленосной толщи южной части Якшинского месторождения калийно-магниевых солей представлено несколькими формами, в том числе включениями, содержащими бактерии [1].

Цель работы – выделение и идентификация микроорганизмов из образцов рассолов, извлеченных в ходе подземного растворения сильвинита и карналлита из скважин Якшинского месторождения солей (Республика Коми).

Для исследования были взяты образцы: (1) воды из гидрогеологической скважины, используемой для подземного растворения солей; (2) рассола, извлеченного в ходе подземного растворения сильвинита (скважина №30); (3 и 4) рассолов с хлопьевидными образованиями красно-коричневого цвета, извлеченных в ходе подземного растворения карналлитов (скважина №31) в августе-сентябре 2019 года. Растворение солей осуществляется на глубинах 411,9-416,0 м (скв. № 30) и 412,6-416,0 м (скв. № 31). Указанные интервалы в разрезе скв. №30 сложены переслаиванием пластов сильвинита и каменной соли, в скв. №31 – переслаиванием пластов карналлитовой породы и каменной соли.

Из образцов рассолов была выделена тотальная ДНК с использованием набора реактивов Fast DNA spin kit for soil («MP Biomedicals», Франция), которую далее использовали в качестве матрицы для ПЦР. Амплификацию фрагментов генов 16S рРНК проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров 27F и 1492R [2]. В результате амплификации были получены ПЦР-продукты, что свидетельствует о наличии бактерий во всех образцах воды и рассолов. Фрагменты генов 16S рРНК, полученных с тотальной ДНК образцов, были секвенированы на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США). Поиск гомологов генов 16S рРНК проводили в международной базе данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>). Анализ полученных электрофореграмм нуклеотидных последовательностей показал, что

метагеномная ДНК образцов (1-4) является гетерогенной, то есть в воде (1) и рассолах (2-4) присутствуют группы микроорганизмов, различающиеся на филогенетическом уровне.

Выделение чистых культур микроорганизмов из образцов рассолов осуществляли методом прямого посева на агаризованную богатую среду Раймонда (30, 100 г/л NaCl) [2]. Бактериальные культуры были выделены из всех образцов. Для исследования были отобраны бактерии, изолированные из разных образцов и отличающиеся по морфологии колоний при росте на агаризованной среде.

Идентификация микроорганизмов путем секвенирования фрагментов генов 16S рНК (размером 833-964 п.н.) и анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что выделенные из рассолов (образцы 2-3) штаммы являются представителями класса *Gammaproteobacteria* (роды *Halomonas*, *Marinobacter*, *Idiomarina*) и класса *Actinobacteria* (род *Dietzia*) (таблица). Из образца 1 при длительном культивировании (3 месяца) были выделены бактерии в количестве не более 1×10^2 клеток/мл воды, которые были идентифицированы как представители родов *Naumannella*, *Mycolicibacterium*, *Williamsia* (класс *Actinobacteria*).

Таблица

Идентификация бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК

Штамм	Сходство, %	Типовой штамм ближайшего родственного вида (номер в базе данных GenBank)
Образец 2, рассол без хлопьев		
YM1	99,38	<i>Idiomarina ramblicola</i> R22 ^T (PIQC01000012)
YM2	99,23	<i>Halomonas songnenensis</i> NEAU-ST10-39 ^T (JQ762289)
YM3	99,24	<i>Halomonas titanicae</i> BH1 ^T (AOP001000038)
YM5	99,46	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T (AJ295143)
Образец 3, рассол с хлопьевидными образованиями		
YM7	99,27	<i>Idiomarina ramblicola</i> R22 ^T (PIQC01000012)
YM8	99,56	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 ^T (AF212204)
YM9	99,89	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 ^T (X79290)
		<i>Dietzia kunjamensis</i> subsp. <i>Kunjam-ensis</i> DSM 44907 ^T (RAQB01000007)
YM11	99,56	<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS ^T (AJ564880)
YM12	99,35	<i>Halomonas venusta</i> DSM 4743 ^T (AJ306894)
		<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG ^T (AJ640133)
YM18	100	<i>Dietzia psychralcaliphila</i> JCM 10987 ^T (AB159036)
Образец 4, рассол с хлопьевидными образованиями		
YM13	99,35	<i>Idiomarina ramblicola</i> R22 ^T (PIQC01000012)
YM14	100	<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS ^T (AJ564880)
YM15	100	<i>Marinobacter guineae</i> M3B ^T (AM503093)
YM17	99,89	<i>Halomonas glaciei</i> DD 39 ^T (AJ431369)
Вода из гидрогеологической скважины (образец 1)		
VS19	94,71	<i>Naumannella halotolerans</i> WS4616 ^T (FR832425)
VS21	100	<i>Mycolicibacterium frederiksbergense</i> DSM 44346 ^T (AJ276274)
VS23	100	<i>Williamsia muralis</i> DSM 44343 ^T (RBKV01000001)

По результату анализа секвенированной ДНК (ген 16S рНК), выделенной из образца 3, высказано предположение, что в соляной породе скважины №31 доминируют бактерии, филогенетически близкие типовому штамму *Idiomarina ramblicola* R22^T, который был изолирован из гиперсоленой воды в Испании [3]. Далее, из всех трех образцов рассолов

(скважины №30 и №31) были выделены штаммы, близкородственные по гену 16S рРНК представителям этого вида бактерий (таблица).

В образце 2 выявлены умеренно-галофильные бактерии семейства *Halomonadaceae* (роды *Halomonas* и *Chromohalobacter*). Из образцов 3 и 4 выделены, кроме представителей рода *Halomonas*, грамположительные бактерии видов рода *Dietzia* и грамтрицательные галофильные бактерии рода *Marinobacter* (таблица).

Таким образом, впервые из глубинных соляных пород (карналлит, сильвинит, каменная соль) Якшинского месторождения солей выделены галофильные и галотолерантные бактерии. Филогенетический анализ изолятов показал их сходство с бактериями родов *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Idiomarina* и *Dietzia*, которые ранее были изолированы из высокоминерализованных экотопов, в том числе, из района разработок Верхнекамского месторождения солей [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Интересен факт, что несколько близкородственных типовых штаммов были изолированы из низкотемпературных (Антарктика) мест обитания [8, 9, 10]. Изучение филогенетического и физиолого-экологического разнообразия микроорганизмов калийных солей Якшинского месторождения будет продолжено.

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

Библиографический список

1. Органическое вещество соляной толщи южной части Якшинского месторождения калийно-магниевых солей / С.Н. Шанина [и др.] // Геохимия. – 2018. – № 7. – С. 693-708.
2. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей / Е.С. Корсакова [и др.] // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 2. – С. 247-250.
3. *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain / M.J. Martinez-Canovas [et al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 1793-1797.
4. *Halomonas songnenensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline and alkaline soils / J. Jiang [et al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2014. – V. 64. – P. 1662-1669.
5. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris* / F.A. Rainey [et al.] // Int J Syst Bacteriol. – 1995. – V. 45. – P. 32-36.
6. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic / C. Sanchez-Porro [et al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2010. – V. 60. – P. 2768-2774.
7. *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy) / I. Romano [et al.] // J Gen Appl Microbiol. – 2006. – V. 52. – №. 6. – P. 339-348.
8. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica, an alkaliphilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium / A. Poli [et al.] // Syst Appl Microbiol. – 2007. – V. 30. – P. 31-38.
9. Montes M.J., Bozal N., Mercade E. *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment // Int J Syst Evol Microbiol. – 2008. – V. 58. – P. 1346-1349.
10. *Halomonas glaciei* sp. nov. isolated from fast ice of Adelie Land, Antarctica / G.S. Reddy [et al.] // Extremophiles. – 2003. – V. 7. – P. 55-61.

ДИАГНОСТИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВЛАЖНОСТИ ПАХОТНОГО ГОРИЗОНТА ЧЕРНОЗЕМНЫХ ПОЧВ, ВЫЯВЛЕННОЕ ПО ДАННЫМ МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СЪЕМКИ

Рудик Н.И.

МГУ им. Ломоносова, факультет почвоведения, г.Москва, Россия.

Ключевые слова: мониторинг почвенного покрова, данные дистанционного зондирования, влажность, черноземы

В последние годы методы аэрокосмического дистанционного зондирования в географических исследованиях приобретает все большее практическое значение. Данные дистанционного зондирования (ДДЗ) позволяют исследователям получать актуальную и однородную информацию высокого качества для обширных и труднодоступных территорий в кратчайший период времени.

В настоящее время состояние дистанционных методов мониторинга характеризуется активным развитием средств цифрового анализа и интеграцией с ГИС-технологиями, наряду с формированием информационного поля открытых источников данных. В совокупности это позволяет проводить анализ полученной информации с выработкой новых критериев и признаков, характеризующих состояние почвенного покрова.

Мониторинг почвенного покрова пахотных земель является одной из ключевых мер по сохранению почв как основы обеспечения продовольственной безопасности мировых государств.

Одной из главнейших проблем лесостепной и степной зон европейской части России является повсеместное проявление современного вторичного гидроморфизма черноземных почв, представляющих особую ценность в сельскохозяйственном отношении [2]. Переувлажнение почв затрудняет процесс их механизированной обработки, и с интенсивным возрастанием степени гидроморфности почв происходит ухудшение их гидрофизических свойств. Впоследствии, земельные участки становятся менее качественными в агрономическом отношении.

Сложности изучения изменения влажности почвенного покрова вызваны, главным образом, периодическим характером переувлажнения. Примечательно, что даже длительное увлажнение почв зачастую не вызывает видимых изменений в морфологии черноземов [8]. На сегодняшний момент разработаны методы мониторинга влажности почв, основанные на применении спутниковой информации по данным мультиспектральной космической съемки [4].

В рамках проведения исследования было диагностировано изменение увлажненности пахотного горизонта почвенного покрова Белгородской области с привлечением данных разновременных снимков Landsat-TM5 с 1987 по 2010 год включительно.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Белгородская область располагается в пределах юго-западного склона Среднерусской возвышенности. В рельефе преобладают всхолмленные приподнятые равнины, сильно расчлененные овражно-балочной сетью [1].

Климат – умеренно континентальный с относительно мягкой со снегопадами и оттепелями зимой и жарким, часто с засухами и суховеями летом. Среднегодовое количество осадков составляет 400 - 600 мм.

Типичные черноземы (около 30 % почвенной площади области) вместе с перемежающимися с ними выщелоченными и оподзоленными занимают большую часть территории области.

В связи с тем, что питание подземных вод местности осуществляется преимущественно за счет инфильтрации атмосферных осадков, а также из поверхностных водотоков, процессы подтопления природного происхождения, связаны как с периодами интенсивных и продолжительных ливней и/или наводнений вследствие половодий и паводков. Примечательно, что процесс заболачивания почв может развиваться при влиянии дернового процесса. При достаточном или избыточном переувлажнении под луговыми травами происходит формирование плотной мощной дернины, в толще которой накапливается мёртвое органическое вещество, которое резко ухудшает аэрацию дернины. Как результат, рыхлокустовые злаки сменяются плотнокустовыми, имеющими узел кущения над поверхностью почвы, что в результате приводит к образованию кочек и изменению рельефа местности. Образовавшийся кочковатый микрорельеф препятствует стоку воды, в результате чего происходит застой влаги [9].

Мониторинг пространственно-временных изменений влажности почвенного покрова производился с использованием космических снимков Landsat-TM5. Для исследования использовались сцены разных лет съемки (1987 и 2010 г.), полученные при безоблачной погоде в осенний период. При дешифрировании снимков зимнего сезона осуществлению почвенного мониторинга препятствует снежный покров, в то время как летнего – растительный.

Дальнейшая работа со снимками проводилась с привлечением пакета прикладных программ ILWIS 3.3 [4]. Были отобраны каналы Landsat-TM5 1-2-3-4 видимого и ИК диапазонах спектра. В дальнейшем для каждого изображения были произведены геометрическое совмещение каналов космосъемки на основе комбинации выбранных спектральных каналов, а впоследствии – классификация снимков на 3 класса: открытая поверхность почвы, водные объекты и растительность. С этой целью для снимков обоих лет по формуле был подсчитан вегетационный индекс NDVI и осуществлен экспертный подбор значений индекса для каждого класса [3].

Следующим этапом работы являлась арифметическая корректировка тона изображения открытой поверхности почвы, т.е. вычислялась разница в тоне изображений более позднего и раннего сроков съемки. Для каждой разницы была исследована гистограмма распределения разностных величин. В основу лег принцип преобладания разницы, близкой к 0 (отсутствие изменений тона). В случае больших отличий модальных значений тона (более 10 значений от 0) вводилась корректирующая поправка тона для приведения его к 0.

Следующим шагом стало создание маски открытой поверхности почвы лишенной растительного покрова для изображений обоих лет. Пороговые значения для класса «открытая поверхность почв» подбирались индивидуально для каждой сцены и «с припуском» с целью исключения сомнительных полей.

Затем изображения обоих лет съемки пересекали друг с другом и анализировали исключительно те участки изображения, на которых в оба срока съемки почвенный покров был без растительности. На всех исходных сценах Landsat незамаскированными оставляли только подобные участки.

Впоследствии, сравнивая значения и их изменения в каждом из каналов в динамике, мы анализировали изменения пахотного горизонта почв с 1987 года по 2010 год и интерпретировали их. Поканально вычитались изображения более позднего и раннего сроков съемки с целью вычисления разницы в тоне изображения. Для этого была

проанализирована гистограмма распределения разностных величин. Считалось, что должны преобладать значения, близкие к 0 (отсутствие изменений тона). Впоследствии разностные изображения каждого канала были разделены на классы:

- сильно уменьшился – менее -25;
- тон немного уменьшился – от -25 до -10;
- нет изменений – от -10 до +10;
- немного увеличился – от +10 до +25;
- сильно увеличился – более +25.

Затем карты классов разниц последовательно пересекали друг с другом. Полученный перечень всех комбинаций изменений для каждого пикселя интерпретировался на основе исследования, проведенного Савиным и др. [7].

Впоследствии, цифровая почвенная карта Белгородской области [6] была импортирована в ГИС, привязана географически и отвекторизована. Вся информация легенды карты была помещена в атрибутивную таблицу к карте.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С применением пакета прикладных программ ILWIS была создана карта изменений свойств пахотного горизонта почв для территории Белгородской области за промежуток исследования (рис.1).

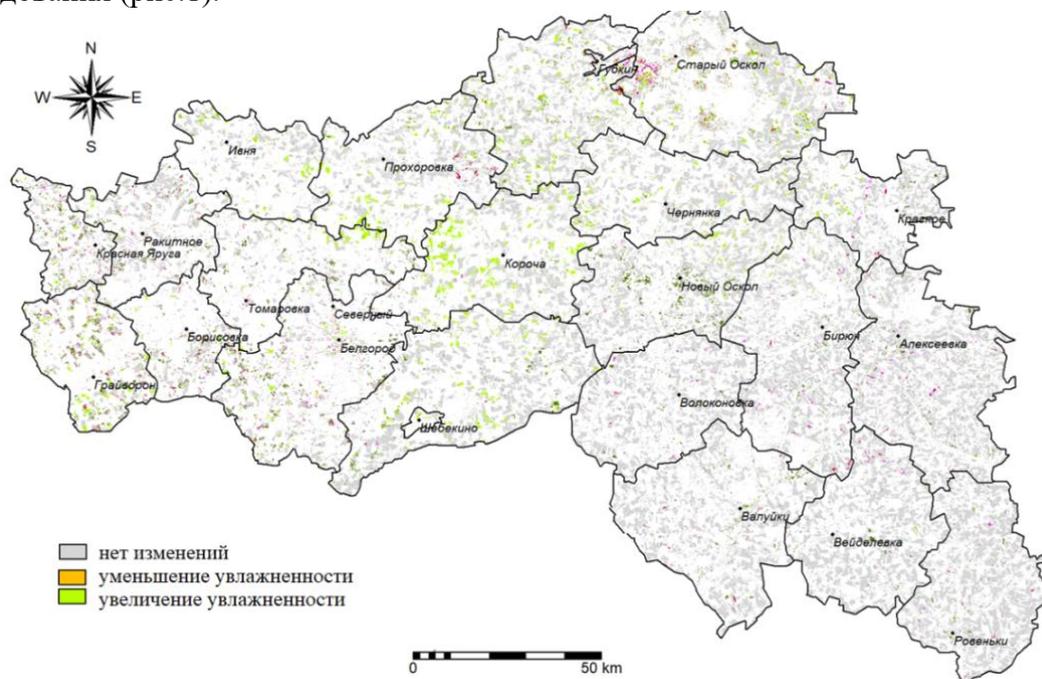


Рисунок 1 – Карта изменений увлажненности пахотного горизонта почв Белгородской области с 1987 по 2010 год

В общей сложности было проанализировано 779506 га пахотных почв, что составляет 62,7 % от общей площади пашни области.

Автоматически были подсчитаны площади и доли почв Белгородской области с изменением увлажненности пахотного горизонта в сторону уменьшения и увеличения за исследуемый 23-летний период (таблица 1).

Анализируя полученные данные, можно диагностировать увеличение увлажненности почвенного покрова области по данным 2010 года по сравнению с 1987 г, отмеченное на 5,8% территории пашни. При этом тенденция к уменьшению увлажненности почв практически полностью отсутствует (отмечалась менее чем на 0,1 % исследуемой территории). Вероятно, причиной этому послужили изменения климатические изменения,

и, по всей видимости, это связано с очень небольшой исходной площадью гидроморфных почв на пашне области.

Таблица 1

Выявленные площади изменений гидроморфности пахотного горизонта почв с 1987 по 2010 год

Свойство почв	Доля почв с разным трендом (%) от проанализированной площади пашни	Площадь (га)
Уменьшение увлажненности	0,05	779,51
Увеличение увлажненности	5,75	44824,71
Без изменений	86,07	670921,23
Прочие изменения свойств почвенного покрова	8,13	63378,24

Полученные результаты согласуются с многолетним трендом увеличения климатической увлажненности юга степной зоны [5]. На основе сопоставления полученной карты (рис. 1) и цифровой модели рельефа местности SRTM позволило сделать вывод, что увеличение гидроморфности пахотного горизонта характерно преимущественно для почв, приуроченных к отрицательным формам рельефа как на водоразделах, так и на мезосклонах.

Библиографический список

1. Большая российская энциклопедия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://bigenc.ru/geography/text/5676142>, свободный. – (дата обращения 03.09.2020)
2. Деградация геосистем Белгородской области в результате хозяйственной деятельности / Ю.Г. Чендев, А.Н. Петин, Е.В. Серикова [и др.] // География и природные ресурсы. – 2008. – № 4. – С. 69-75.
3. Рудик Н.И., Савин И.Ю., Голованов Д.Л., Габдуллин Б.С. Тенденции изменения почв на юго-западе Белгородской области. Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. 2019; (96): – С.47-63.
4. Савин И.Ю. Аэрокосмические методы в сельском и лесном хозяйстве: компьютерный практикум. – М.: РУДН, 2015. – 112 с.
5. Савин И.Ю., Марков М.Л., Овечкин С.В., Исаев В.А. Тренд общей обводненности европейской части России, выявленный по спутниковым данным GRACE. Бюллетень Почвенного института имени В.В. Докучаева. – 2016. – (82). – С. 28-41.
6. Савин И.Ю., Жоголев А.В. Цифровая почвенная карта Белгородской области, Центр почвенных данных Почвенного института им. В.В. Докучаева, 2018.
7. Тренды деградации пахотных почв России, выявленные по спутниковым данным Landsat / Савин И.Ю., Исаев В.А., Шишконокова Е.А. [и др.] // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. – 2016. – № 4. – С. 53-55.
8. Тищенко С.А., Колесников С.И., Горбов С.Н., Николаева А.С. Влияние локального переувлажнения на численность бактерий чернозема миграционно-сегрегационного Ростовской области // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 3.
9. Хрисанов В.А., Колмыков С.И. Современные природные факторы, способствующие процессу заболачивания на территории Белгородской области // Проблемы природопользования и экологическая ситуация в Европейской России и сопредельных территориях: материалы VII междунар. науч. конф. (памяти проф. Петина А.Н.), Белгород, 24-26 окт. 2017 г. / НИУ БелГУ, Русское географическое общество. – Белгород, 2017. – С. 270-274.

ПОДБОР УСЛОВИЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

Сагидуллина В.И.¹, Хасанова Р.А.¹, Ахова А.В.^{1,2}, Ткаченко А.Г.²

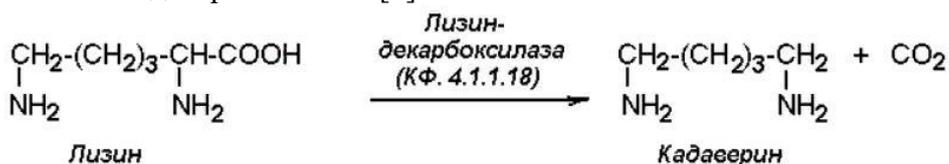
¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: кадаверин; декарбоксилаза; лизин;

Полиамины – это поликатионные соединения, содержащие различное количество аминогрупп (в основном от 2 до 4), которые присутствуют у всех форм организмов, участвуя в различных биологических процессах, к примеру, синтезе дезоксирибонуклеиновой кислоты, рибонуклеиновой кислоты и белка, а также в клеточном делении [1]. Помимо этого, полиамины помогают справляться бактериальным клеткам с различными стрессами, в том числе воздействием активных форм кислорода (АФК), ультрафиолета (УФ), нагревания [2]. Известно, что полиамины имеют важное физиологическое значение и необходимы для нормального роста, однако их специфические функции не изучены полностью *in vivo*. У *Escherichia coli* полиамины представлены путресцином (1,4-диаминобутан), спермидином (N-(3-аминопропил)-1,4-диаминобутан) и кадаверином (1,5-диаминопентан) [1].

Кадаверин образуется путём прямого декарбоксилирования L-лизина при участии фермента – лизиндекарбоксилазы [3].



В синтезе кадаверина участвуют два типа лизиндекарбоксилаз: конститутивная LdcS и индуцибельная CadA. Они имеют на 68% одинаковые аминокислотные последовательности, однако максимальная активность LdcS наблюдается при pH около 7,5, а оптимальный pH для проявления активности CadA равен 5,5. Помимо этого CadA имеет более высокую активность и термостабильность [3].

Полиамины также имеют важное практическое значение для человека. В частности, 1,5-диаминопентан может быть использован в качестве одного из мономеров в процессе синтеза полиамидов. Полиамиды на основе кадаверина показывают высокую прочность на разрыв, высокие температуры плавления и устойчивость к органическим растворителям [3]. Производство полиаминов в промышленных масштабах основано, главным образом, на химическом синтезе, для которого требуются невозобновляемые нефтехимические продукты, суровые условия реакции, а также дорогие каталитические системы [4]. Поскольку реагенты для получения полиаминов химическим синтезом являются высокотоксичными и легко воспламеняющимися, химический синтез нежелателен с экологической точки зрения и с точки зрения здоровья человека [5]. Таким образом, разработка биотехнологического процесса производства полиаминов из возобновляемого сырья является актуальной задачей.

Разрабатываемые сегодня биотехнологии синтеза 1,5-диаминопентана основаны на использовании целлюлозно-клеточных биокатализаторов или выделенных ферментов синтеза кадаверина [6]. Поскольку лизиндекарбоксилазы являются цитоплазматическими белками,

для их выделения необходимо разрушить клеточную оболочку. Существует несколько способов лизиса клеток с целью выделения белка, в частности, воздействие лизирующих агентов, последовательное замораживание-оттаивание, френч-пресс и обработка ультразвуком (соникация). Простым, воспроизводимым, относительно дешевым и доступным способом выделения белков, позволяющим сохранить их ферментативную активность, является обработка биомассы ультразвуком (УЗ).

Целью настоящего исследования явился подбор условий ультразвуковой обработки клеток *E. coli* для выделения лизиндекарбоксилаз с сохранением их ферментативной активности.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использован штамм *E. coli* K12, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

E. coli K12 культивировали в 50 мл бульона LB с добавлением в среду 25 мкг/мл стрептомицина при $T=37^{\circ}\text{C}$ и 100 об/мин на качалке GFL-1092 (Германия) в течение 20 часов. Далее полученную культуру, содержащую $(4,20 \pm 2,77) \cdot 10^9$ КОЕ/мл, подвергали ультразвуковой обработке.

Для проведения ультразвуковой обработки 1 мл бактериальной культуры помещали в микропробирки объемом 2 мл, предварительно отмыв клетки дважды в цитратно-фосфатном буфере (рН 7,5, 100 мМ). Разрушение клеточной стенки *E. coli* K12 осуществляли с использованием ультразвукового дезинтегратора CPX-130 с диаметром щупа 6 мм (Cole-Parmer, США). Варьировали время обработки и амплитуду озвучивания.

Для определения количества колониеобразующих единиц (КОЕ) 10 мкл бактериальной культуры, последовательно разведенной в физрастворе, высевали каплями на агаризованную среду LB.

Количество белка определяли по методу Лоури [7].

Активность лизиндекарбоксилазы определяли по количеству продукта реакции (кадаверина), образуемого 1 мг белка в минуту. Для определения концентрации образующихся в реакционной смеси полиаминов, проводили их дериватизацию дансилхлоридом [8]. В микропробирках объемом 2 мл смешивали раствор пробы, дансил хлорида и карбоната натрия. Инкубировали реакционную смесь в течение 2 часов в термостате при $T=37^{\circ}\text{C}$. По окончании реакции смесь выпаривали и экстрагировали бензолом. Далее проводили тонкослойную хроматографию дансил-полиаминов. Высушенные хроматограммы фотографировали в ультрафиолетовом свете, возбуждающем свечение пятен дансил-полиаминов сине-зелёного цвета, величина и яркость которых пропорциональны их концентрации. Количественный анализ полиаминов проводили методом внешнего стандарта.

Результаты и их обсуждение

Задачей исследования явился подбор таких условий ультразвуковой обработки бактериальных клеток (общего времени обработки, продолжительности одного цикла соникации и амплитуды озвучивания), которые бы позволили получить наибольшее количество белка без потери ферментативной активности.

Поскольку при обработке ультразвуком наблюдалось нагревание суспензии клеток, что могло негативно повлиять на ферментативную активность лизиндекарбоксилаз, все операции по выделению фермента проводили на ледяной бане.

На первом этапе исследования мы оценили эффективность разрушения клеток при обработке ультразвуком по остаточному количеству колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в суспензии клеток. При одинаковом времени одного цикла озвучивания ($\tau=30$ секунд) количество КОЕ после 8 циклов обработки уменьшилось на 10^4 при амплитуде 40%, на

10⁶ при амплитуде 50% и на 10⁷ при амплитуде 60%. При обработке суспензии бактериальных клеток ультразвуком с амплитудой 50% после пяти 60-секундных циклов количество КОЕ уменьшилось на 10⁸, а после седьмого цикла ни одной жизнеспособной клетки не осталось. Хотя с повышением амплитуды увеличивалась эффективность разрушения клеток, более высокая амплитуда (60%) вызывала вспенивание суспензии, что могло привести к денатурации белка и потере его активности. Кроме того, при увеличении времени одного цикла обработки до 60 секунд происходило нагревание проб, что также могло вызвать денатурацию белка.

В последующих экспериментах определялось количество экстрагированного белка в зависимости от амплитуды звука и количества повторов 30-секундных циклов. Самая высокая концентрация белка обнаруживалась в экстракте, полученном при обработке ультразвуком с амплитудой 40%. Количество экстрагированного белка увеличивалось в течение четырех циклов обработки, достигая максимального значения к пятому циклу, и снижалось после шести циклов соникации. Уменьшение количества белка с увеличением общего времени озвучивания может быть связано с его разрушением при ультразвуковой обработке.

Как показало измерение активности лизиндекарбоксилаз LdcC и CadA *in vitro* в грубом клеточном экстракте, при обработке ультразвуком с амплитудой 40% высокий уровень ферментативной активности сохранялся на протяжении шести 30-секундных циклов соникации. При амплитуде 50% фермент сохранял свою активность на протяжении четырех циклов (30 с), тогда как после пятого цикла наблюдалось снижение лизиндекарбоксилазной активности, которое может быть связано с дестабилизацией структуры белка.

Заключение

Подобраны оптимальные условия для разрушения клеток с помощью ультразвуковой обработки с целью получения грубого клеточного экстракта для последующего анализа активности лизиндекарбоксилаз и их использования для разработки биотехнологического способа получения 1,5-диаминопентана. По результатам работы для выделения белков из клеток *E. coli* с сохранением их лизиндекарбоксилазной активности предложены следующие условия: обработка бактериальной культуры ультразвуком с амплитудой 40-50% на холоду в течение 2-2,5 минут 30-секундными циклами с охлаждением между ними.

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

Библиографический список

1. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms // *Microbiological Reviews*. – 1985. – V. 49. – P. 81-99.
2. Rhee H.J., Kim E-J., Lee J.K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules // *J. Cell. Mol. Med.* – 2007. – V. 11. – № 4. – P. 685-703.
3. Ma W., Chen K., Li Y, Hao N., Wang X., Ouyang P. Advances in cadaverine bacterial production and its applications // *Engineering*. – 2017. – V. 3. – P. 308-317.
4. 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.
5. 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.
6. de Carvalho C. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes // *Biotechnol Adv.* – 2011. – V. 29. – № 1. – P. 75-83.

7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – № 1. – P. 265-275.

8. Чудинов А.А., Чудинова Л.А., Коробов В.П. Метод определения низкомолекулярных олигоаминов в различном биологическом материале // Вопросы медицинской химии. – 1984. – № 4. – С. 127-132.

ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО АГЕНТА КАМФЕЦИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОРРЕЛЯТЫ ОБМЕНА БИЛИРУБИНА

Сальникова О.П.¹, Фатьянова А.В.¹, Яровая О.И.^{1,2}, Салахутдинов Н.Ф.^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия.

²ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Ключевые слова: камфецин, римантадин, печень, билирубин, гепатоциты.

Билирубин – тетрапиррол желтого цвета – образуется при расщеплении тетрапиррольного кольца гема гем-оксигеназой с образованием СО и биливердина, который быстро восстанавливается до билирубина через активность биливердинредуктазы в ретикулоэндотелиальных клетках печени и селезенки [1]. Незначительное повышение концентрации билирубина в сыворотке крови имеет скорее положительные последствия, так как билирубин играет роль мощного антиоксиданта [2], обладает защитными свойствами относительно канцерогенеза, и его повышенная концентрация связана с уменьшением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [3,4]. Соответственно, низкая концентрация билирубина зачастую бывает связана с развитием ишемической болезни сердца или дефицитом железа в организме. При увеличении концентрации билирубин откладывается в тканях организма, вызывая негативные последствия, такие как желтуха, желтуха новорожденных, психические расстройства, церебральный паралич и другие повреждения головного мозга. Зачастую гипербилирубинемия может приводить к летальному исходу [5,6].

Печень - это один из основных органов, ответственный за преобразование и выведение не только билирубина, но и многих ксенобиотиков из организма, в частности, нового лекарственного агента камфецина ((1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола), разработанного и синтезированного в НИОХ СО РАН [7]. Это соединение камфоры показало высокую противовирусную активность в отношении вирусов гриппа А H1N1, H3N2, H5N2 и гриппа В при низкой токсичности соединения. Камфецин оказывает действие через ингибирование поверхностного гликопротеина НА вируса гриппа, ответственных за ранние стадии проникновения вируса в клетку [8,9]. Камфецин метаболизируется в печени с образованием глюкуронида, иминокислоты и сульфата камфецина [10]. Однако остается не до конца изученным влияние камфецина на метаболизм билирубина как важного показателя состоятельности печени.

В настоящее время остается не до конца изученным влияние нового противовирусного агента камфецина на особенности метаболизма и распределения билирубина в организме. В связи с этим целью работы явилось изучение содержания билирубина в крови и гепатоцитах в условиях длительного введения нового противовирусного агента камфецина.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на самках крыс линии WAG с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Введение лекарственных агентов осуществляли внутрижелудочно один раз в сутки, в качестве растворителя использовали 20 мкл раствора твин-80, общий раствор доводили до объема 1 мл физиологическим раствором. Крысы (n=34) были разделены на 6 групп: по две группы контроля (введение физиологического раствора), камфецина (100 мг/кг массы) и препарата сравнения римантадина (100 мг/кг массы) в течение 7 и 14 суток.

Определение концентрации общего и конъюгированного билирубина в плазме крови проводили методом Йендрашика-Грофа с использованием набора реагентов «Билирубин-Ново» (вариант 1) В-8020 Вектор БЕСТ» (Россия) по прилагаемым протоколам на цифровом колориметре AP-700 (Mobile photoelectric colorimeter, Япония). Для изучения структуры печени ткань обезвоживали по стандартной методике и заливали в среду Histomix (Биовитрум, Россия). Парафиновые срезы толщиной 7 мкм получали на микротоме HM 340 (Microm, Германия). Препараты окрашивали по методу Ван-Гизон-Фуше для визуализации отложения билирубина в ткани печени. Препараты изучали под световым микроскопом Axioscop 40 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объективов x20, x40, x63. Снимки препаратов выполнены с использованием цифровой фотонасадки AxioCam MRC, использовали пакет программ AxioVision 4.6 (Carl Zeiss, Германия).

Достоверность различий между значениями контрольной и экспериментальных групп крыс оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок с использованием пакета программ Statistica 8.0. Также проводили двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, где в качестве независимых переменных были взяты влияния вводимого лекарственного агента и длительности введения. Достоверными признавали различия при $p < 0,05$. В работе данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Результаты. В ходе анализа полученных данных две контрольные группы (введение физиологического раствора в течение 7 и 14 суток) не показали статистически достоверных различий, поэтому результаты были объединены в единую группу контроля.

Было выявлено, что введение камфецина в течение 7 суток не приводит к достоверному увеличению концентрации общего билирубина в плазме крови по сравнению с группами контроля и римантадина сроком введения 7 суток, а при увеличении срока введения агента до 14 суток наблюдается достоверное снижение концентрации общего билирубина только по сравнению с животными, получавшими камфецин 7 суток ($p < 0,05$). Римантадин не оказал достоверного влияния на концентрацию общего билирубина (Рис.1). Двухфакторный дисперсионный анализ не показал достоверного влияния вводимого лекарственного агента ($F_{1,9}=3,69$, $p > 0,05$), длительности введения ($F_{1,9}=0,03$, $p > 0,05$), а также их взаимодействия ($F_{1,9}=4,15$, $p > 0,05$, табл. 1).

В ходе эксперимента обнаружили достоверное увеличение концентрации конъюгированного билирубина в плазме крови крыс из группы введения камфецина в течение 7 суток по сравнению с группами контроля ($p < 0,05$, Рис.1), введения римантадина в течение 7 суток ($p < 0,05$) и введения камфецина в течение 14 суток ($p < 0,001$). Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние лекарственного агента ($F_{1,9}=13,32$, $p < 0,05$, табл.1), срока введения камфецина и римантадина ($F_{1,9}=39,06$, $p < 0,05$) и взаимодействия факторов ($F_{1,9}=13,99$, $p < 0,05$).

Несмотря на выявленные биохимические различия, при светооптическом исследовании срезов, окрашенных по Ван-Гизон-Фуше, изменений локализации общего билирубина и состояния соединительной ткани выявлено не было (Рис 2).

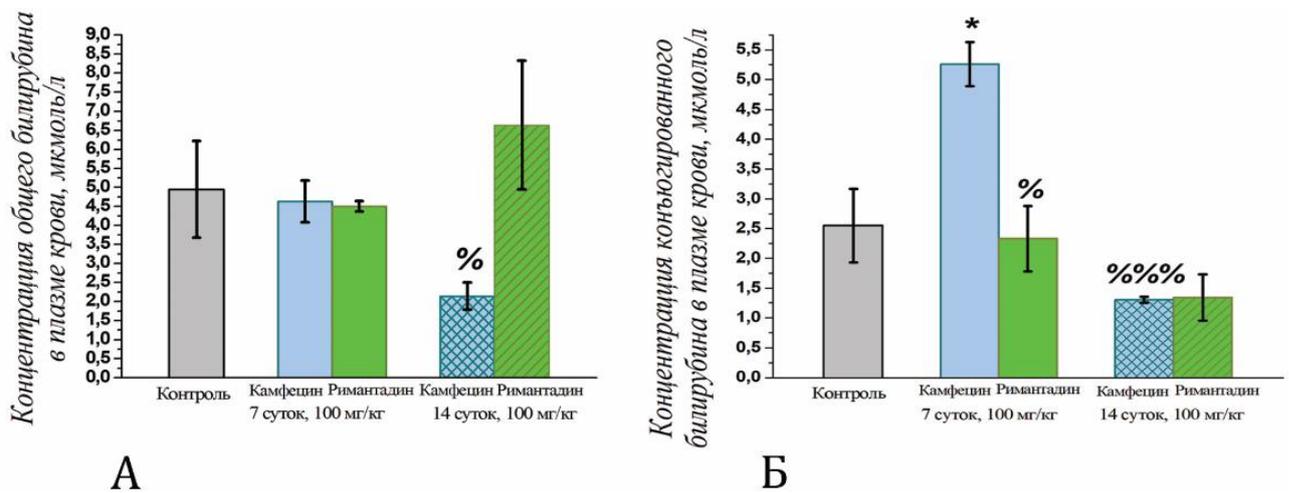


Рис 1: Концентрация общего (А) и конъюгированного (Б) билирубина в плазме крови, ммоль/л. Примечания: * $p < 0,05$ - по сравнению с группой контроля, % $p < 0,05$, % % % $p < 0,001$ по сравнению с группой введения камфецина в течение 7 суток.

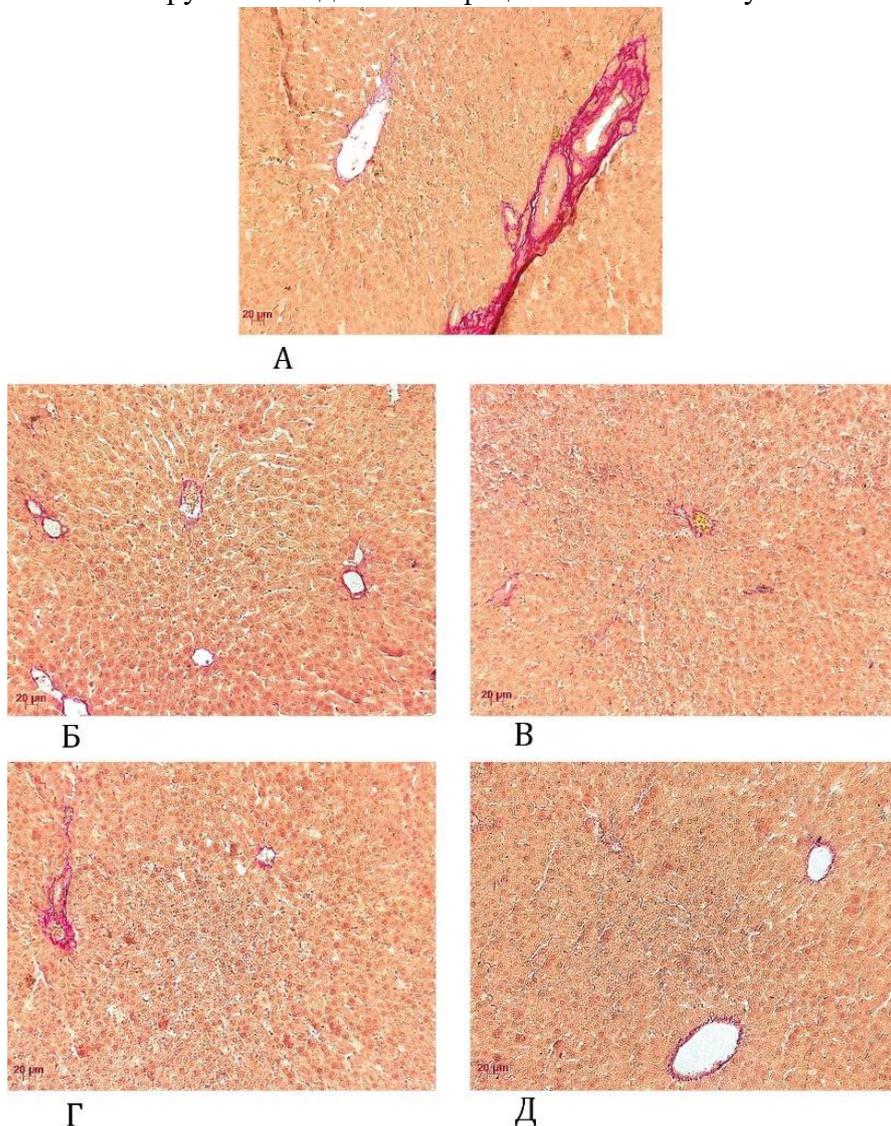


Рис 2: Выявление отложения билирубина в печени крыс линии WAG: А - контрольная группа, Б - введение камфецина в течение 7 суток, В – введение римантадина в течение 7 суток, Г – введение камфецина в течение 14 суток, Д – введение римантадина в течение 14 суток. Окр. по Ван-Гизон-Фуше, об. х20.

Обсуждение. В крови млекопитающего билирубин циркулирует в двух основных состояниях: свободном (неконъюгированном) и связанном с глюкуроновой кислотой (конъюгированном). Неконъюгированный билирубин нерастворим в воде и ведет себя как липофильное соединение, а значит, имеет высокую проницаемость через липидный бислой клетки, потому секреция неконъюгированного билирубина печенью или почками неэффективна, он быстро диффундирует обратно в кровь [1].

В ходе эксперимента было выявлено, что камфецин не оказывает влияния на содержание общего билирубина при введении в течение 7 суток, а римантадин не вызывал изменений при всех исследованных сроках введения. Это указывает на отсутствие негативного влияния лекарственных агентов.

Однако снижение уровня общего билирубина в плазме крови при введении камфецина в дозировке 100 мг/кг в течение 14 суток по сравнению с 7-суточным введением может указывать на ускоренное выведение билирубина из организма, что может стать одной из возможных причин повышения риска развития окислительного стресса в клетках, сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца и атеросклероз [11]. При этом дисперсионный анализ показал, что концентрация общего билирубина не подвержена влияниям ни лекарственного агента, ни длительности введения, что подтверждает гомеостатическую важность данного параметра и, соответственно, выраженную динамическую стабильность.

Конъюгация билирубина происходит в результате избирательного поглощения нерастворимого билирубина, связанного с альбумином, гепатоцитами и связывания поглощенных молекул с глюкуроновой кислотой с помощью уридиндифосфат-глюкурозилтрансферазы [12]. Водорастворимые глюкурониды транспортируются через мембрану желчных протоков при помощи АТФ-зависимого транспортера или цитоплазматических белков с высоким сродством к билирубину. В желчном пузыре конъюгированный билирубин становится компонентом желчи, после чего в ее составе попадает в просвет кишки, а следом за ней может заново попасть в кровяное русло и либо выводится почками с мочой, либо под действием бактерий повторно метаболизируется и выводится из организма с калом [13,14]. К белкам, причастным к поглощению печенью конъюгированного и ряда других веществ, в числе которых и лекарственные средства, относят органические анион-транспортирующие полипептиды (ОАТР), и в особенности их подвиды ОАТР1А, ОАТР1В1 и ОАТР1В3 у человека [15]. ОАТР1А1 крысы может транспортировать конъюгированный билирубин *in vitro* с высокой аффинностью [16]. В случае «выключения» этого белка, концентрация конъюгированного билирубина в плазме крови подопытных грызунов резко увеличивалась [17]. В процессе изучения этого феномена в 2010 году была выдвинута гипотеза о циркуляции конъюгированного билирубина посредством слаженной работы двух семейств белково-транспортных систем, в которой представители ОАТР-семейства белков были ответственны за обратное поглощение попавшего в портальный кровоток конъюгированного билирубина [18].

Таким образом, нарушение функционирования белков ОАТР-семейства могло стать одной из причин увеличения концентрации конъюгированного билирубина в плазме крови крыс, получавших камфецин в дозировке 100 мг/кг массы в течение 7 суток, при неизменяющейся концентрации общего билирубина. Кроме того, известно, что некоторые лекарственные средства, в том числе и противовирусные агенты, способны повышать концентрацию конъюгированного билирубина в плазме крови без иных признаков изменения печени [19,20]. Отсутствие достоверных изменений в остальных опытных группах может указывать на преобладание компенсаторных реакций организма. Анализ двухфакторного дисперсионного комплекса свидетельствует о функциональной

лабильности уровня конъюгированного билирубина, поскольку все изученные факторы и их взаимодействие оказали достоверное влияние.

Несмотря на изменение содержания биохимически выявляемого билирубина, не обнаружено структурных изменений при светооптическом изучении срезов печени (Рис.2) у всех экспериментальных групп, что, по-видимому, может указывать на отсутствие патологических перестроек структуры в условиях вводимых лекарственных агентов и подтверждает безопасность вводимых соединений.

Таким образом, проведенное исследование показало, что камфецин, вводимый в дозировке 100 мг/кг массы тела в течение 7 суток в отличие от 14 суток, приводит к функциональному ответу печени, проявляющемуся увеличением концентрации конъюгированного билирубина при отсутствии изменения уровня общего билирубина, однако структурного ответа эти функциональные особенности не имеют, что указывает на отсутствие гепатотоксического влияния.

Таблица 1

Анализ двухфакторного дисперсионного комплекса. Концентрация общего и конъюгированного билирубина в плазме крови, Ед/л

Источник изменчивости	Сумма квадратов отклонений, SS	Степени свободы, df	Средний квадрат, MS	F-критерий	P
Концентрация общего билирубина					
Введение агентов (камфецин/римантадин)	15,21	1	15,21	3,69	0,09
Длительность введения (7 или 14 суток)	0,11	1	0,11	0,03	0,87
Взаимодействие факторов введения агентов и длительности введения	17,10	1	17,10	4,15	0,07
Ошибка	37,07	9	4,11		
Концентрация конъюгированного билирубина					
Введение агентов (камфецин/римантадин)	6,69	1	6,69	13,32	0,005
Длительность введения (7 или 14 суток)	19,61	1	19,61	39,06	0,00015
Взаимодействие факторов введения агентов и длительности введения	7,03	1	7,03	13,99	0,0046
Ошибка	4,52	9	0,5		

Примечание: жирным шрифтом выделены значения $p < 0,05$.

Библиографический список

1. Levitt DG, Levitt MD. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. // Clin Exp Gastroenterol. – 2014 - №7 - P.307–328.
2. Dennery P. A. et al. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia //Free Radical Biology and Medicine. – 1995. – Т. 19. – №. 4. – P. 395-404.

3. Keshavan P. et al. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization // *International journal of cancer*. – 2004. – Т. 112. – №. 3. – P. 433-445
4. Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease // *Clinical chemistry*. – 2000. – Т. 46. – №. 11. – P. 1723-1727.
5. Boon AC, Bulmer AC, Coombes JS, Fassett RG. Circulating bilirubin and defense against kidney disease and cardiovascular mortality: mechanisms contributing to protection in clinical investigations. // *Am J Physiol Renal Physiol*. – 2014. – Т 307 – P. 123–136.
6. Kaplan M, Hammerman C, Understanding severe hyperbilirubinemia and preventing kernicterus: adjuncts in the interpretation of neonatal serum bilirubin. // *Clin Chim Acta* – 2005 – 356 – P.9–21
7. Яровая ОИ, Соколова АС, Третьяк ТС, Зарубаев ВВ, Киселев ОИ, Салахутдинов НФ. Патент на изобретение № 2530554. Применение 1,7,7 – триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-илиден-аминоэтанола в качестве ингибитора репродукции вируса гриппа, 2013
8. Yarovaya O.I., Sokolova A.S, Shernyukov A.V., Pokrovsky M.A., Pokrovsky A.G, Lavrinenko V.A, Zarubaev V.V., Tretiak T.S, Anfimov P.M., Kiselev O.I., Beklemishev A.B., Salakhutdinov N.F. New quaternary ammonium camphor derivatives and their antiviral activity, genotoxic effects and cytotoxicity // *Bioorg. Med. Chem.* - 2013 - 21 - P.6690-6698.
9. Zarubaev V. V. et al. Selection of influenza virus resistant to the novel camphor-based antiviral camphene results in loss of pathogenicity // *Virology*. – 2018. – Т. 524. – С. 69-77.
10. Rogachev A.D., Yarovaya O.I., Fatianova A.V., Lavrinenko V.A., Amosova E.V., Zarubaev V.V., Pokrovsky A.G., Salakhutdinova N.F. Untargeted search and identification of metabolites of antiviral agent camphene in rat urine by liquid chromatography and mass spectrometry and studying their distribution in organs following peroral administration of the compound // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* -2018 - 161 - P.383–392
11. Kapitulnik, J., and Maines, M. D. The role of bile pigments in health and disease: effects on cell signaling, cytotoxicity, and cytoprotection. *Front. Pharmacol.* – 2012 – 3 – P.136
12. Erlinger, S., Arias, I. M., & Dhumeaux, D. (2014). Inherited Disorders of Bilirubin Transport and Conjugation: New Insights Into Molecular Mechanisms and Consequences. // *Gastroenterology*. – 146(7) – P.1625–1638.
13. Sticova, E., and Jirsa, M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. // *World J. Gastroenterol.* 19, - 2013 – P.6398–6407.
14. Franklin Herlong FH, Mitchell MC. Laboratory tests. In: Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell MF, editors. *Schiff's diseases of the liver*. // Wiley-Blackwell - 2012. - P.17–43.
15. Klaassen C. D., Aleksunes L. M. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation // *Pharmacological reviews*. – 2010. – Т. 62. – №. 1. – P. 1-96
16. Reichel C. et al. Localization and function of the organic anion–transporting polypeptide Oatp2 in rat liver // *Gastroenterology*. – 1999. – Т. 117. – №. 3. – P. 688-695
17. Lu H. et al. Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR // *Toxicological sciences*. – 2008. – Т. 103. – №. 1. – P. 35-45
18. Ose A. et al. Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier // *Drug metabolism and disposition*. – 2010. – Т. 38. – №. 1. – P. 168-176
19. Van de Steeg E, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, Burggraaff JE, de Waart DR, Elferink RP, Kenworthy KE, Schinkel AH. Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs. // *J Clin Invest.* - 2010 – 120 – P.2942–2952,

20. Iusuf D, van de Steeg E, Schinkel AH. Functions of OATP1A and 1B transporters in vivo: insights from mouse models. // Trends Pharmacol Sci. – 2012 – 33 – С.100–108

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ ЭРОРГОРГИАЕНА, ИНГИБИТОРА МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ

Сидоров Р.Ю.^{1,2}, Кашеварова Н.М.¹, Ткаченко А.Г.^{1,2}

¹ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН-филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: туберкулёз, антибиотики, персистенция, (p)ppGpp, МЛУ-ТБ

Туберкулёз – заболевание, с трудом поддающееся лечению существующими антибиотиками, многие из которых были разработаны еще полвека назад. По статистике 2019 года в России 13% заболевших имели туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) [1]. Штаммы туберкулёза с МЛУ не реагируют, по меньшей мере, на изониазид и рифампицин, два самых мощных противотуберкулезных препарата первой линии, делая лечение этими антибиотиками неэффективным. В случае лекарственной устойчивости некоторые штаммы возбудителя приобретают устойчивые генетические изменения: либо гены резистентности, которые инактивируют лекарственный препарат, либо мутации, которые изменяют клеточную мишень, делая ее невосприимчивой к антибиотику.

Помимо МЛУ есть еще одна значительная проблема: по статистике 2019 года 20% заболевших имели рецидив инфекции даже после успешного первоначального лечения антибиотиками [1]. Высокий риск рецидива приводит к необходимости применять многомесячную терапию высокими дозами одновременно нескольких антибиотиков. При этом снижение продолжительности курса с 6 до 4 месяцев повышает риск рецидива в 2,5 раза [2]. Интенсивный режим приема лекарственных средств нагружает как организм пациента, так и бюджет здравоохранения – стоимость лечения одного пациента составляет около 300 тысяч рублей для легкой формы болезни (I режим терапии) и может достигать стоимости в 3 миллиона рублей для туберкулёза с лекарственной устойчивостью (V режим терапии) [3]. В то же время рецидив заболевания требует повторного курса с применением более дорогих препаратов [3], что приводит к многократному увеличению стоимости лечения и увеличивает нагрузку на организм пациента.

Особая склонность туберкулёза к рецидивам обусловлена способностью микобактерий (возбудителей туберкулёза) к персистенции и биопленкообразованию [4], что позволяет им долговременно выживать в легких и других органах носителя в латентной форме, без признаков болезни. Клетка бактерии, проявляющая свойство персистенции, в отличие от резистентной бактерии, не имеет специализированных генов или мутаций для защиты от определенного антибиотика. Вместо этого она запускает свои внутренние защитные механизмы: до воздействия антибиотика клетка впадает в состояние замедления метаболизма, что позволяет в некоторых случаях предотвратить повреждение клеточной мишени антибиотика [4].

Клетки-персисторы представляют собой небольшую часть любой популяции бактерий, в целом чувствительной к антибиотикам. В состоянии торможения

метаболизма клетки-персистеры способны пережить действие антибиотика, а после окончания лечения могут возобновить рост, что сопровождается рецидивом инфекции. При этом потомство таких клеток будет проявлять чувствительность к антибиотикам, однако снова образует небольшую часть персистерных клеток, которая обеспечит выживание в дальнейшем [5]. Напротив, резистентные клетки всегда сохраняют свое свойство нечувствительности в ряду поколений, так как оно обусловлено изменением генов, а не метаболизма [4].

Лечение туберкулёза подразделяется на 2 этапа: короткая интенсивная фаза, цель которой подавить активно размножающуюся бактериальную популяцию, и длительная фаза продолжения лечения, в ходе которой для предотвращения риска рецидива устраняется латентная туберкулёзная инфекция (без признаков заболевания), причиной которой называют персистенцию [4]. Антибиотики первой линии наиболее активны в отношении быстрорастущих клеток начальной фазы, но слабо воздействуют на покоящиеся формы микобактерий, что приводит к длительному и неэффективному лечению латентного туберкулёза с большим процентом рецидивов [4].

В результате возникает потребность в разработке нового класса антибиотиков, предотвращающих образование персистерных клеток микобактерий, ответственных за рецидивы инфекции. Одним из возможных способов реализации такого свойства является подавление систем синтеза алармона (p)ppGpp [5], сигнальной молекулы бактерий, ассоциированной с персистенцией, образованием биопленок и адаптацией к различным видам стресса [6]. Способность воздействовать на системы синтеза (p)ppGpp обнаружена нами у DMNP, химически синтезированного производного эрогоргиаена.

Природное соединение эрогоргиаен впервые изолировали из восьмилучевого коралла *Antillogorgia elisabethae* (synonym *Pseudopterogorgia elisabethae*), определили его химическую структуру и обнаружили у него мощную антибактериальную активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [7]. Дальнейшие исследования, ставшие возможными благодаря полному стереоселективному химическому синтезу (-)-эрогоргиаена и его эписмера, показали его способность подавлять клинические изоляты *M. tuberculosis*, устойчивые к рифампицину и изониазиду [8]. На основе эрогоргиаена получено его полностью синтетическое производное DMNP.

Нами впервые показано, что DMNP, в отличие от традиционных антибиотиков, проявляет наибольшую активность в отношении клеток стационарной фазы *M. smegmatis*, в которой доля клеток-персистеров максимальна; в то время как рифампицин, тетрациклин и стрептомицин – часто используемые противотуберкулезные лекарства – действуют преимущественно в отношении активно растущих клеток экспоненциальной фазы роста, практически не проявляя бактерицидного эффекта в стационарной фазе [9].

В дальнейших исследованиях нами была установлена способность DMNP блокировать синтез (p)ppGpp, молекулы стринджен-ответа бактерий, связанной с персистенцией. Алармон (p)ppGpp у бактерий синтезируется белками из суперсемейства гомологов RelA/SpoT (RSH), которые бывают двух типов: длинные RSH, способные и к синтезу, и к расщеплению (p)ppGpp; и малые алармон-синтетазы (SAS), способные только к синтезу [6]. У *M. smegmatis* есть белки обоих типов: длинная (p)ppGpp-синтетаза/гидролаза Rel_{Msm} и малая (p)ppGpp-синтетаза RelZ. У *M. tuberculosis* также есть белки обоих типов, однако активность его SAS-белка пока не обнаружена. Есть данные, что нокаутный штамм *M. tuberculosis* с удаленным геном *rel_{Mtb}* не способен к долговременному выживанию и формированию хронической инфекции в мышечной модели туберкулёза [10], потому ингибирование синтеза (p)ppGpp у микобактерий

является перспективным механизмом действия для антибиотика в борьбе с латентным туберкулезом.

На ранней фазе исследования было обнаружено, что пик транскрипционной активности гена rel_{Msm} у *M. smegmatis*, измеренной при помощи слияния промотора rel_{Msm} и репортерных генов *luxAB*, приходится на тот же этап роста культуры, на котором DMNP оказывает наибольшее антибактериальное действие – этап перехода в стационарную фазу. Далее получены экспериментальные данные, которые продемонстрировали, что белок Rel является мишенью DMNP. Генно-инженерный штамм *M. smegmatis* с контролируемой экспрессией белка Rel_{Msm} имел большую выживаемость в присутствии DMNP, если экспрессия была увеличена индукцией по сравнению с контролем без индукции, то есть дополнительные единицы белка-мишени смягчили антибактериальный эффект. Очищенный белок Rel_{Msm} в присутствии DMNP проявлял меньшую активность синтеза (p)ppGpp в реакции *in vitro*. В то же время штамм с делецией гена rel_{Msm} был более чувствительным к DMNP по сравнению с штаммом-родителем, что подчеркивает роль белка Rel_{Msm} как мишени DMNP и, кроме того, указывает на существование других мишеней DMNP в *M. smegmatis* [9].

В качестве дополнительной мишени была идентифицирована малая алармон-синтетаза RelZ. В экспериментах контролируемой экспрессией RelZ индуцированная культура была менее чувствительна к DMNP, чем не индуцированная, что наблюдалось и для Rel_{Msm} . Нокаутный штамм с двумя делециями генов rel_{Msm} и $relZ$ оказался еще более чувствительным к DMNP по сравнению с штаммом с одиночной делецией rel_{Msm} . То есть DMNP обладает блокирующей активностью в отношении обоих типов (p)ppGpp-синтетаз: и длинных RSH, и малых алармон-синтетаз.

На основании этих данных возможно построить модель взаимодействия лиганда DMNP и белков-мишеней Rel_{Msm} и RelZ. Так как белки принадлежат к одному суперсемейству RSH, оба обладают (p)ppGpp-синтетазным доменом и имеют 30% сходства аминокислотной последовательности, можно сделать предположение об общем механизме действия для обоих типов белков.

Кристаллографические 3D-структуры для белков Rel_{Msm} и RelZ пока не получены, поэтому для построения модели были использованы 3D-структуры гомологичных белков других видов: Rel_{Mtb} из *Mycobacterium tuberculosis* (PDB ID: 5XNX; 92% а/к сходства с Rel_{Msm}) и RelP из *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 6EWZ; 29% сходства с RelZ).

Для обнаружения сайта связывания DMNP на поверхности белков Rel и SAS мы использовали метод молекулярного докинга «вслепую» при помощи Achilles Blind Docking Server [11], который оптимизирован для анализа всей поверхности структуры белка в поисках лучших карманов связывания лиганда. Область на поверхности Rel_{Mtb} с наибольшей энергией связывания (-7.00 ккал/моль) располагается вблизи активного сайта синтетического домена, катализирующего синтез (p)ppGpp из ГТФ/ГДФ (Рисунок 1).

При поиске области связывания DMNP на SAS-белке RelP был обнаружен кластер связывания №4 (-5.40 ккал/моль), имеющий сходство с карманом связывания Rel_{Mtb} -DMNP и близлежащий к сайту синтеза (p)ppGpp. При выравнивании аминокислотных последовательностей Rel_{Mtb} и RelP при помощи BLASTp аминокислоты, связывающие DMNP, оказывались вблизи, что указывает на то, что оба результата моделирования DMNP принадлежат одному и тому же карману связывания, находящемуся вблизи от активного сайта синтетического домена этих белков (Рисунок 1).

Анализируя результаты молекулярного докинга и экспериментальные данные, можно сделать следующий вывод: DMNP может взаимодействовать как с

аминокислотами длинного белка RSH (Rel_{Mtb}), так и с аминокислотами SAS ($RelZ$), которые участвуют в связывании субстрата GTP или расположены рядом с активными центрами через общий механизм благодаря структурному сходству этих белков, тем самым подавляя синтез (p)ppGpp.

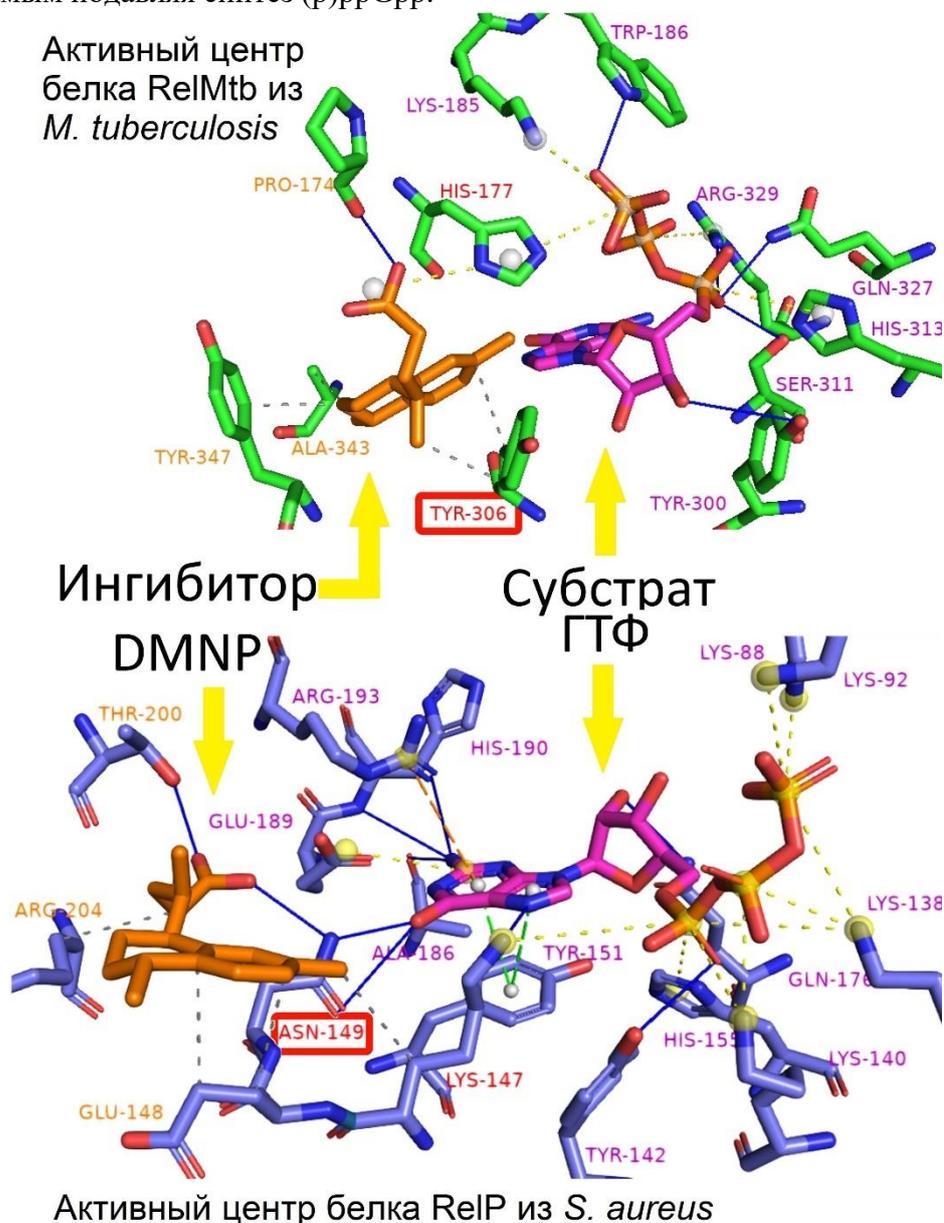


Рисунок 1. Механизм действия DMNP на длинные белки RSH и малые алармон-синтетазы проанализирован с использованием молекулярного докинга на основе белков *M. tuberculosis* Rel_{Mtb} и *S. aureus* $RelP$ в качестве моделей. В прямоугольник заключены аминокислоты, указывающие на соответствие мест связывания при выравнивании BLASTp.

Попытки обнаружения таких свойств давно предпринимаются учеными всего мира. Среди антибиотиков, используемых в клинической практике при лечении туберкулеза, на данный момент не было обнаружено вещества с аналогичным механизмом действия ингибитора (p)ppGpp-синтетазы, хотя подобные свойства имеются у витамина C, но в очень слабой форме при больших дозировках [12].

Ученые использовали различные подходы к поиску соединения, обладающего свойствами ингибитора (p)ppGpp-синтетаз. Используя принцип подобия субстрату фермента, ученые из Израиля [13] и позднее из Индии [14] разработали релацин и его

производные, которые представляют собой модифицированную молекулу субстрата ГТФ, эффективно подавляют синтез (p)ppGpp путем конкурентного ингибирования и ограничивают образование персистеров *M. smegmatis*. Тем не менее, такой подход имеет потенциальные недостатки: химический синтез релацина требует сырья в виде ГТФ и потому затруднен в промышленных масштабах; ГТФ имеет функции не только у бактерий, но и у человека, то есть релацин может иметь нежелательные эффекты.

В 2019 году ученые из США провели массовый скрининг библиотек химических соединений и, проанализировав 2 миллиона веществ, обнаружили ингибитор (p)ppGpp-синтетазы Rel_{Mtb} под названием X9 [15]. Такой подход требует больших затрат ресурсов, а обнаруженное вещество, хотя и эффективно подавляет (p)ppGpp-синтетазу Rel_{Mtb}, может оказаться неактивным в отношении малых алармон синтетаз (другой категории (p)ppGpp-синтетаз), так как поиск проведен применительно к Rel_{Mtb}.

Другой подход, представляющий собой поиск среди природных веществ, обладает рядом преимуществ: природные соединения всегда имеют ту или иную мощную биологическую активность и чаще обладают биодоступностью, которая зачастую определяет потенциал будущего лекарства. Являясь синтетическим производным природного соединения, DMNP способен эффективно подавлять как длинные (p)ppGpp-синтетазы Rel, так и малые алармон-синтетазы микобактерий.

Разработка нового лекарства – сложный многостадийный процесс: от обнаружения вещества до регистрации лекарственного препарата может потребоваться много лет исследований. У предложенного антибиотика есть ряд преимуществ: разработана схема полного химического синтеза до соединения-лидера DMNP, начиная с доступных химикатов; данный класс соединений имеет новый уникальный механизм действия – ингибирование (p)ppGpp-синтетаз, не обнаруженный у существующих лекарств; будущий препарат направлен на сокращение длительности лечения инфекции и предотвращение рецидивов, что делает его инновационным и потенциально может значительно уменьшить стоимость лечения туберкулеза (который входит в перечень социально значимых заболеваний). Современный подход к разработке лекарств со знанием механизма действия вещества и использованием компьютерного моделирования позволит в сотни раз сократить расходы на поиск соединений-кандидатов, оптимизацию и разработку соединения, а значит в целом сократить стоимость будущего лекарства.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290001).

Библиографический список

1. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации в 2018 году: Основные показатели по туберкулезу за 2019 год // Федеральный центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза в РФ. – 2020.
2. Grace A.G. et al. (Cochrane Infectious Diseases Group) Shortened treatment regimens versus the standard regimen for drug-sensitive pulmonary tuberculosis / The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 12: CD012918. – 2019.
3. Ягудина Р. И., Сороковиков И.В. Фармакоэкономика туберкулеза: методологические особенности проведения исследований / Фармакоэкономика: Теория и практика. – Том 2. – №4. – 2014.
4. Mandal S. et al. The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery / Mandal S., Njikan S., Kumar A. et al. // Microbiology. – №165. – С.492–499. – 2019.
5. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Молекулярные механизмы персистенции бактерий. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 97(3): 271–279. – 2020.

6. Kushwaha G.S. Stringent response protein as a potential target to intervene persistent bacterial infection / Kushwaha G.S., Oyeyemi B.F., Bhavesh N.S. // *Biochimie*. – №165. – P. 67-75. – 2019.
7. Rodriguez A.D. Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the West Indian Sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* / Rodriguez A.D., Ramirez C. // *Journal of Natural Products*. – Vol. 64. – No. 1. – 2001.
8. Incerti-Pradillos C.A. Asymmetric total synthesis of (-)-erogorgiaene and its C-11 epimer and investigation of their antimycobacterial activity / Incerti-Pradillos C.A., Kabeshov M.A., O’Hora P.S. et al. // *Chemistry European Journal*. – Vol. 22. – P. 1–8. – 2016.
9. Сидоров Р.Ю. Молекулярный механизм действия нового антибиотика, подавляющего формирование персистерных клеток микобактерий / Сидоров Р.Ю., Ахова А.В., Кашеварова Н.М. и др. // *Естественные и технические науки*. – Вып. 10. – С. 90-94. – 2019. ISSN: 1684-2626
10. Weiss L.A, Stallings C.L. Essential roles for *Mycobacterium tuberculosis* Rel beyond the production of (p)ppGpp / *Journal of Bacteriology*. – Vol. 195. – №24. – P. 5629–5638. – 2013.
11. Sanchez-Linares I. High-Throughput parallel blind Virtual Screening using BINDSURF / Sanchez-Linares I., Perez-Sanchez H., Cecilia J.M. et al. // *BMC Bioinformatics*. – Vol. 13. – Suppl 14:S13. – 2012.
12. Syal K. Vitamin C targets (p)ppGpp synthesis leading to stalling of long-term survival and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis* / Syal K., Bhardwaj N., Chatterji D. // *FEMS Microbiology Letters*. – Vol. 364. – 2017.
13. Wexselblatt E. Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response / Wexselblatt E., Oppenheimer-Shaanan Y., Kaspy I. et al. // *PLOS Pathogens*. – Vol. 8. – №9. – 2012.
14. Syal K. Synthetic (p)ppGpp analogue is an inhibitor of stringent response in mycobacteria / Syal K., Flentie K., Bhardwaj N. et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – Vol. 61. – №6. – P. 1–14. – 2017.
15. Dutta N.K. Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence / Dutta N.K., Klinkenberg L.G., Vazquez M.-J. et al. // *Science Advances*. – №5. – P.1–13. – 2019.

ЧИСЛЕННОСТЬ И ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КИШЕРТСКОГО РАЙОНА

Смирнова А.Б., Смирнова А.В.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: численность, мелкие млекопитающие, ловушки Геро, видовое разнообразие.

Мелкие млекопитающие это группа животных небольших размеров, которые относятся в основном к двум отрядам класса – насекомоядные и грызуны. Эти зверьки широко расселены по планете, ведут преимущественно скрытный образ жизни и способны быстро размножаться (давать несколько пометов за календарный год). Поэтому они часто используются учеными-биологами для различных научных исследований.

С 2013 года на территории Кишертского района Пермского края сотрудниками и студентами биологического факультета ПГНИУ проводятся ежегодные отловы мелких

млекопитающих для морфофизиологических, краниометрических, этологических и других исследований. Отлов животных производится с помощью ловушек-давилок Геро, которые устанавливаются по 50 штук на 4 суток со стандартной приманкой. Данный метод позволяет установить численность и видовое разнообразие мелких млекопитающих в биотопе. Размещаются ловушки в четырех биотопах: суходольный луг в урочище Посад, разнотравно-злаковый луг и смешанный лес в урочище Камаи, темнохвойный лес на территории заказника «Предуралье».

В итоге, в ловушки попались особи следующих видов. Это обыкновенная полевка *Microtus arvalis*, рыжая полевка *Clethrionomys glareolus*, лесная *Apodemus sylvaticus* и полевая мышь *Apodemus agrarius*, бурозубки род *Sorex*. Видовая принадлежность каждой особи устанавливается при анализе черепов и зубной системы животных.

Как видно из таблицы 1. доминирующими видами на лугу в урочище Камаи являются обыкновенная полевка и лесная мышь. Для полевок это типичное местообитание, т.к. они предпочитают селиться на открытых луговых и полевых, включая культурные землях. [3] Лесная мышь регулярно попадает в ловушки на данном биотопе, что связано с зарастанием луга деревьями и кустарниками, а также сорной растительностью. В ходе сукцессии на данном месте будет смешанный лес, если не вмешается человек и поэтому в последние два года в наших отловах с Камайского луга стали встречаться рыжие полевки, которые предпочитают закрытые, лесные биотопы.

В свою очередь рыжая полевка является фоновым видом в обоих лесных ценозах. Этот представитель отряда грызунов обитает практически во всех типах лесов, где населяет осветленные, поросшие кустарниками местообитания. Второй, часто встречающийся вид в данных лесах – лесная мышь. Однако количество отловленных мышей намного меньше, чем рыжих полевок, что говорит о их меньшей численности на территории этих лесов.

Таблица 1

Количество мелких млекопитающих, отловленных ловушками Геро на территории Кишертского района.

	БИОТОП	луг у д. Камаи	Камайский лес	Посадский луг	Лес, Предуралье	ВСЕГО
	ВИД					
2013	<i>Microtus arvalis</i>	5				5
	<i>Clethrionomys glareolus</i>		19			19
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	7	7			14
	<i>Apodemus agrarius</i>					
	<i>Sorex sp.</i>	1				1
	ВСЕГО		13	26		
2014	<i>Microtus arvalis</i>	18				18
	<i>Clethrionomys glareolus</i>		30			30
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	1				1
	<i>Apodemus agrarius</i>					
	<i>Sorex sp.</i>					
	ВСЕГО		19	30		

2015	<i>Microtus arvalis</i>					
	<i>Clethrionomys glareolus</i>		14			14
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	1				1
	<i>Apodemus agrarius</i>					
	<i>Sorex sp.</i>	1				1
	ВСЕГО	2	14			16
2016	<i>Microtus arvalis</i>	1		14		15
	<i>Clethrionomys glareolus</i>		6			6
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	2				2
	<i>Apodemus agrarius</i>			1		1
	<i>Sorex sp.</i>	8		4		12
	ВСЕГО	11	6	19		36
2017	<i>Microtus arvalis</i>	19		16		35
	<i>Clethrionomys glareolus</i>		15		9	24
	<i>Apodemus sylvaticus</i>		1			1
	<i>Apodemus agrarius</i>	2				2
	<i>Sorex sp.</i>			1		1
	ВСЕГО	21	16	17	9	63
2018	<i>Microtus arvalis</i>	2		4		6
	<i>Clethrionomys glareolus</i>		21		20	41
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	2	1			3
	<i>Apodemus agrarius</i>					
	<i>Sorex sp.</i>					
	ВСЕГО	4	22	4	20	50
2019	<i>Microtus arvalis</i>					
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	3	4		3	10
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	6	3	3	2	14
	<i>Apodemus agrarius</i>	2				2
	<i>Sorex sp.</i>	1		3		4
	ВСЕГО	12	7	6	5	30
2020	<i>Microtus arvalis</i>	51		38		89
	<i>Clethrionomys glareolus</i>	2	47		21	70
	<i>Apodemus sylvaticus</i>	5			25	30
	<i>Apodemus agrarius</i>			9		9
	<i>Sorex sp.</i>	6	4	18	2	30
	ВСЕГО	64	51	65	48	228

Реже, чем в луговых отловах в лесу нам попадались представители отряда насекомоядные, род *Sorex*. Это "универсальные" землеройки, способные жить в самых различных местообитаниях. Обитают они в лесах, лесостепях, тундрах, в поймах рек и на лугах. Виды в рамках этого рода трудноразличимы. Точное определение бурозубок возможно лишь по деталям строения черепа, что будет проведено в будущем.

В выборке мелких млекопитающих, которая собрана с Посадского луга преобладает обыкновенная полевка (таб.1). Ее не было в отловах только в 2019 году, когда нами была зафиксирована демографическая яма для данного вида и обыкновенная полевка не попала в ловушки и на Камайском лугу. Посадский луг по площади больше луга в урочище Камаи, относится к территории заброшенных сельскохозяйственных земель и на данный момент

времени зарастает сосной и кустарниковой растительностью, встречаются также сорные травы. Поэтому он является типичным биотопом для обыкновенной полевки, полевой мыши и бурозубки, но вместе с ними населяют территорию луга лесные мыши. Численность *Apodemus sylvaticus* в урочище Посад низкая и потому они попадаются в ловушки не регулярно. По аналогии с Камайским лугом Посадский луг в будущем может стать лесным биотопом.

Таким образом, среди мелких млекопитающих на выборочных территориях Кишертского района преобладают представители отряда Грызуны (рис.1.). Фоновыми видами являются обыкновенная и рыжая полевки, что характерно для фауны Пермского края. Северная граница ареала обитания этих полевок проходит за территорией Пермского края в области тундры, до центральных районов Кольского п-ова, Архангельска, низовьев Печоры. [4] Эти же виды грызунов будут составлять основу пищевого рациона хищных птиц в Кишертском районе.

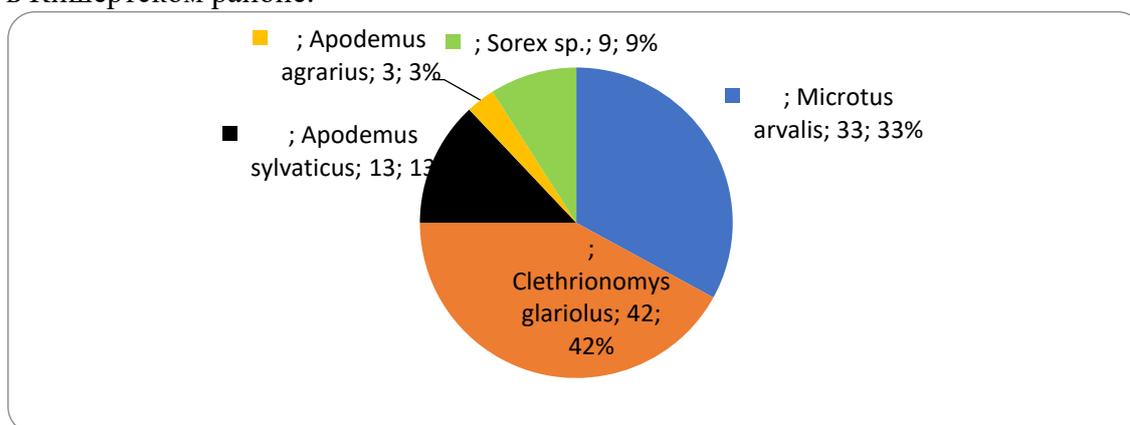


Рис.1. Видовое разнообразие мелких млекопитающих в некоторых биотопах Кишертского района Пермского края.

При анализе количества животных, отловленных ловушками Геро в четырех биотопах Кишертского района, нами было установлено колебание численности в популяциях всех пойманных видов. Расчет численности проводится методом пропорции на 100 ловушко/суток.

Как показывают результаты, на пике численности одного вида наблюдается снижение численности в популяциях других видов во всех биотопах, кроме темнохвойного леса на территории заказника Предуралье, где два фоновых вида находятся на стадии увеличения числа особей в популяциях (рис. 6.). Подобные колебания численности у животных происходят при одновременном влиянии на их популяции разных экологических факторов. Например, плотность населения всех видов данного биотопа. При повышенной плотности говорят о перенаселении, что вызывает стресс у животных и ведет к подавлению размножения, роста и созревания, а также к повышенной смертности. Количество и качество пищевых ресурсов, в том числе содержание биогенных элементов в кормах влияет на численность грызунов. Воздействие хищников рассматривают как одну из причин колебаний численности грызунов. [1] Кроме того, доказано воздействие климатических факторов на численность популяций полевок и других грызунов, когда значимыми оказываются температурный режим и осадки в течении всего года. [2]

Для рыжей полевки, как и для ряда других представителей отряда грызунов в природе характерны циклические изменения численности и демографической структуры населения, что было изучено в частности Э.В. Ивантером (2005) (рис. 2.).

В изученной Ивантером Э. В. популяции численность рыжик полевки зависит от большого числа факторов, среди которых наиболее существенны демографический состав популяции, состояние популяций совместно обитающих видов, а также погодные и кормовые условия зимнего периода. В осеннее-зимний период и в начале сезона размножения большую роль играют экзогенные факторы (метеоусловия, кормовая база, пресс хищников, конкуренция и др.), а в течение репродуктивного цикла - эндогенные. [5] В итоге, наши исследования и работы Э.В. Ивантера, подтверждают факт цикличности колебаний численности в популяциях мелких млекопитающих под влиянием совокупности различных факторов.

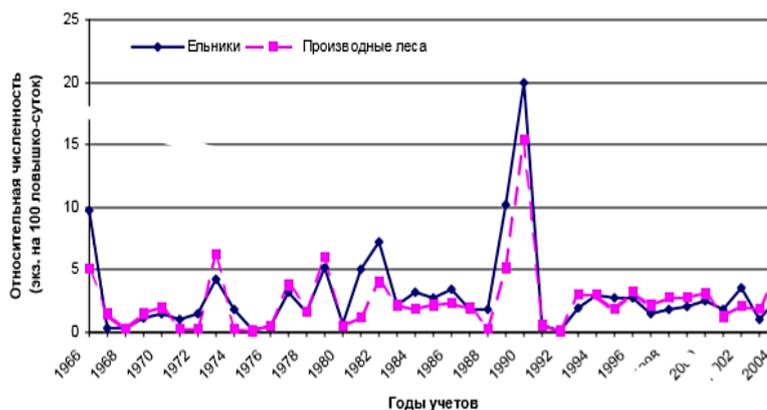


Рис. 2. Многолетняя динамика численности рыжей полевки в ельниках и производных лиственных и смешанных лесах Приладожья.

В связи с тем, что исследуемые нами луговые биоценозы находятся сейчас на стадии зарастания сорной и древесной растительностью, их в последние два года начинают заселять лесные виды грызунов - *Clethrionomys glareolus* и *Apodemus sylvaticus*, составляя тем самым конкуренцию основным луговым видам – обыкновенной полевке и полевой мышью. Если в сукцессию не вмешается человек, то возможно в будущем рыжая полевка станет постоянным видом на Камайском лугу, и потом совсем вытеснит обыкновенную полевку (рис. 3.). В урочище Посад лесная мышь может стать стабильным видом этого биотопа, что может привести к снижению численности *Microtus arvalis* (рис. 5.).

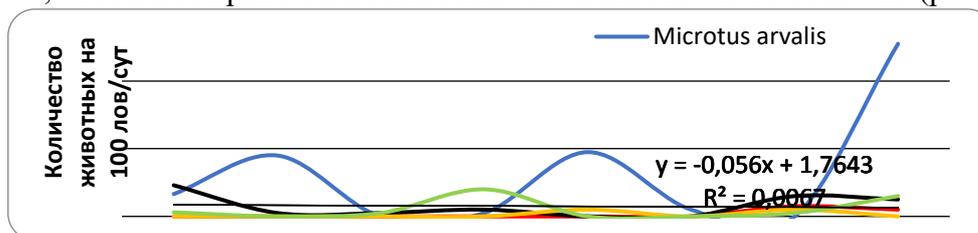


Рис. 3. Колебание численности мелких млекопитающих на лугу в урочище Камаи в Кишертском районе.

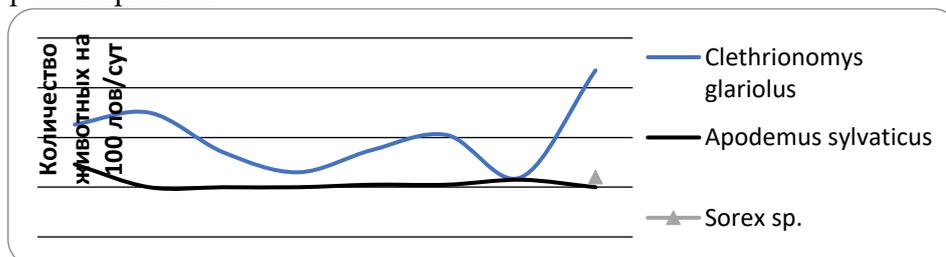


Рис. 4. Колебание численности мелких млекопитающих в Камайском лесу Кишертского района.

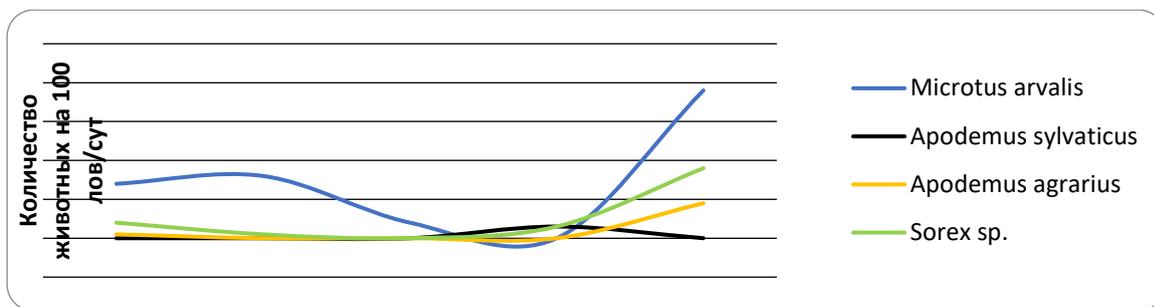


Рис. 5. Колебание численности мелких млекопитающих на лугу в урочище Посад в Кишертском районе.

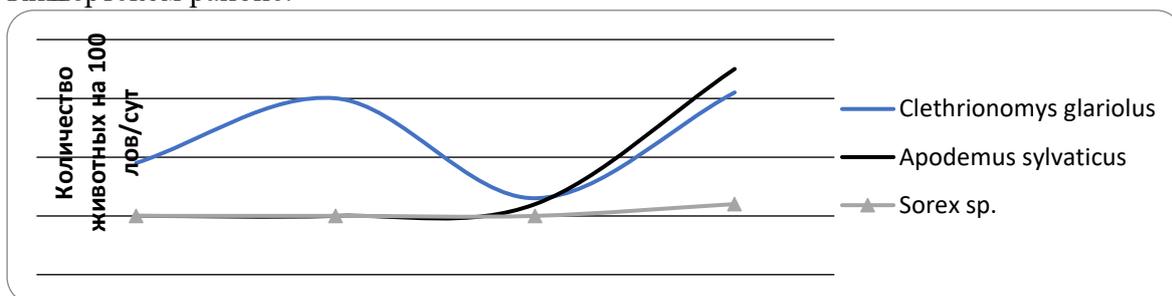


Рис. 6. Колебание численности мелких млекопитающих в темной хвойном лесу на территории заказника Предуралья.

В лесных защищенных биотопах явные колебания численности характерны для доминирующего вида *Clethrionomys glareolus*. Скорее всего, это связано с другими биотическими и абиотическими факторами, нежели с присутствием здесь же лесной мыши. Как видно из рисунка 6, численность полевки и мыши возрастает одновременно. Бурозубки стали встречаться в лесных отловах только в этом году, что может говорить об их успешных периодах зимовки и размножения, и соответственно происходит их активное расселение в лесах. Предполагается, что в следующем году они так же будут присутствовать в отловах ловушками Геро.

Библиографический список

1. Бененсон И. Е., Садыков О. Ф. Динамика численности мелких млекопитающих: концепции, гипотезы, модели. Москва: Наука, 1992. С. 5-7, 11-14, 18-20, 52-54, 57-67, 70-71,
2. Бобрецов А. В., Быховец Н. М., Лукьянова Л. Е., Петров А. Н. Влияние изменения климата на динамику популяций лесных полевок (*Myodes*) Северного Предуралья: роль ландшафтных эффектов // Сибирский экологический журнал. – 2017. - №3. – С. 245-253.
3. Виноградов Б. С., Громов И. М. Грызуны фауны СССР. Москва - Ленинград: Издательство академии наук СССР, 1952. С. 229-230, 242-244.
4. Громов И. М., Ербаева М. А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий // Зайцеобразные и грызуны. Санкт- Петербург: Зоологический институт РАН, 1995. С. 403-405, 463-465.
5. Ивантер Э. В. Популяционные факторы динамики численности рыжей полевки на северном пределе ареала // Биогеография Карелии. Труды Карельского научного центра РАН. Петрозаводский государственный университет. – 2005. - №7. – С. 48-63.

**ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЛИНЕЙНЫХ РАЗМЕРОВ ТЕЛА ПАУКОВ-
КРУГОПРЯДОВ ARANEUS DIADEMATUS CLERCK, 1757 И A. MARMOREUS
CLERCK, 1757 (ARANEAE: ARANEIDAE)**

Тиунов А.В.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: пауки-кругопряды, правило Бергмана, половой диморфизм

Несмотря на изменчивость, линейные размеры тела животных вряд ли являются случайной величиной: так крупные размеры тела с одной стороны часто повышают репродуктивный успех, с другой стороны требуют увеличения либо скорости, либо продолжительности роста [1]. В экспериментальных работах показано, что размеры тела у пауков, с одной стороны, влияют на затраты энергии при ловле добычи [2], с другой стороны, связаны с продолжительностью жизни и плодовитостью [3]. Закономерности варьирования размеров животных находят свое выражения во многих правилах, как эколого-географических, так и филогенетических (к таковым относится, например, правило Ренча – увеличение степени размерного полового диморфизма по мере увеличения размера самок) [4].

Одним из самых известных эколого-географических закономерностей является правило Бергмана (возрастание размера тела гомойотермных животных по мере продвижения к высоким широтам), один из наиболее обсуждаемых примеров клинальной изменчивости [5]. Изучение географических закономерностей варьирования размеров животных представляет интерес в связи с глобальными процессами изменения климата, так как большинство исследователей объясняет Бергмановские клины откликом на климатические факторы [6]. Так, на основе наблюдений за размерами птиц показано статистически значимое увеличение среднего значения и размаха изменчивости массы тела, соответствующее глобальному повышению температуры воздуха [7]. Несмотря на то, что правило сформулировано автором для гомойотермных животных, его применимость в настоящее время изучается на примере разнообразных таксономических групп. Так, обзор работ, посвящённых изменчивости размеров насекомых (Insecta) показывает существование в этой группе видов, демонстрирующих как Бергмановские и анти-Бергмановские клины, так и нелинейные зависимости, либо вообще отсутствие связи между средними размерами особей в популяции и географической широтой. При этом разные авторы, в зависимости от таксона и схемы исследования, предлагают разные объяснения наблюдаемым паттернам изменчивости [8].

Пауки-кругопряды (Araneidae Clerck, 1757) – третье в мире по видовому богатству семейство пауков, насчитывающее более трёх тысяч валидных видов [9]. Для кругопрядов свойственны колесовидные ловчие сети, кроме того, в этом семействе наблюдается размерный половой диморфизм: самцы как правило мельче, чем самки. Несмотря на то, что пауки в целом являются достаточно хорошо изученной группой беспозвоночных, исследования географических размерных закономерностей в этой группе представлены в сравнительно небольшом количестве работ, затрагивающих отдельные семейства (например, по семействам Lycosidae Sundevall, 1833 [10] и Cybaeidae Banks, 1892 [6,7]). В целом, накопление знаний о внутри- и межвидовой изменчивости размеров и размерном половом диморфизме пауков является достаточно важной задачей, часто морфометрические показатели позволяют вносить ясность в различение видов-двойников

[13], могут быть использованы в роли дополнительного аргумента при принятии таксономических решений на уровне семейств [4].

Целью данной работы было охарактеризовать внутривидовую изменчивость размеров широкоареальных пауков-кругопрядов *Araneus diadematus* Clerck, 1757 и *A. marmoreus* Clerck, 1757, выявить межполовые и географические различия.

Материалом для исследования послужили коллекционные фонды кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии ПГНИУ (г. Пермь, куратор С.Л. Есюнин), коллекции Института Систематики и Экологии Животных (г. Новосибирск, куратор Г.Н. Азаркина), коллекции Зоологического Института РАН (г. Санкт-Петербург, куратор В.И. Овчаренко), а также собственные сборы разных лет. Места сбора коллекционного материала указаны на рисунке 1.



Рисунок 1. Места сбора коллекционного материала. Круг – *A. marmoreus*, треугольник – *A. diadematus*. Темная заливка – самцы, светлая заливка – самки.

Идентификация пауков производилась по признакам, основанным на структуре копулятивного аппарата. С помощью окулярного микрометра, установленного на стереомикроскоп МБС-10, были выполнены следующие промеры (рис. 2): длина тела (не замерялась у поврежденных экземпляров), длина и ширина головогруди, длина и ширина брюшка (у экземпляров с поврежденным брюшком не замерялись), длины бедра, голени с коленом, предлапки и лапки первой и второй пары ног. Всего было промерено 248 экземпляров.

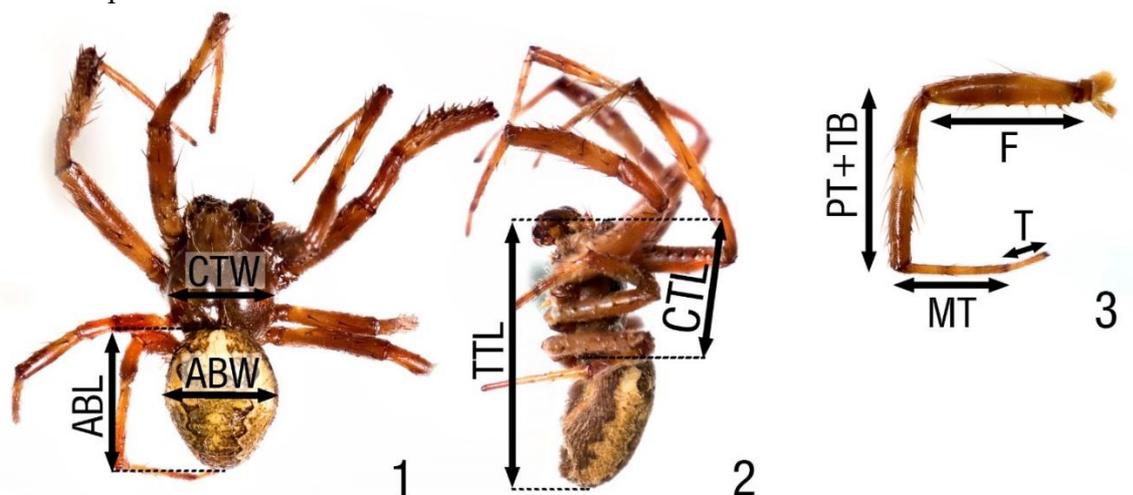


Рисунок 2. Промеры тела пауков, использованные в работе. 1, 2 – самец *A. marmoreus*, вид сверху (1) и сбоку (2), 3 – нога *A. marmoreus*, вид сзади. TTL – длина тела, CTW – длина головогруди (cephalothorax), CTL – ширина головогруди, ABW – длина брюшка (abdomen), ABL – ширина брюшка, F – длина бедра (femur), PT+TV – длина колена с голенью (patella + tibia), MT – длина предлапки (metatarsus), T – длина лапки (tarsus).

Статистические процедуры выполнялись в программе PAST 4.03 [14]. При первичной проверке данных на соответствие нормальному распределению (тест Шапиро-Уилка, принятый уровень значимости здесь и далее 95%) выявлено, что распределение многих параметров отличалось от нормального (таблица 1). В связи с этим были использованы непараметрические методы анализа: критерий Манна-Уитни для сравнения средних, коэффициент корреляции Спирмена, для дисперсионного анализа – критерий Краскелла-Уоллиса и непараметрический дисперсионный анализ с перестановками (PERMANOVA).

Таблица 1.

Средние значения (стандартная ошибка) измерений тела и конечностей *A. diadematus* и *A. marmoreus*. Звездочкой (*) помечены переменные, распределение которых отличается от нормального (тест Шапиро-Уилка, $p < 0.05$). Размеры приведены в миллиметрах.

Обозначения промеров соответствуют рис. 2.

Таксон		n	TTL	CTL	CTW	ABL	ABW
<i>A. diadematus</i>	♀	57	10,68 (0,20)	4,38 (0,08)*	3,56 (0,07)*	7,66 (0,17)	5,78 (0,15)
	♂	10	6,93 (0,34)	3,53 (0,16)	2,79 (0,09)	4,12 (0,19)	2,67 (0,12)*
<i>A. marmoreus</i>	♀	133	11,19 (0,20)*	4,55 (0,07)*	3,86 (0,06)*	8,89 (0,17)*	7,15 (0,15)*
	♂	48	8,23 (0,21)	4,30 (0,11)	3,45 (0,07)	4,80 (0,14)	3,31 (0,10)

Таблица 1 (продолжение).

Таксон		Нога 1				Нога 2			
		F	PT+T B	MT	T	F	PT+T B	MT	T
<i>A. diadematus</i>	♀	4,84 (0,10) *	5,88 (0,13)*	3,89 (0,09) *	1,53 (0,02) *	4,56 (0,10)	5,34 (0,13)*	3,54 (0,09) *	1,42 (0,03) *
	♂	4,68 (0,29) *	6,01 (0,38)*	3,91 (0,25) *	1,35 (0,05) *	4,15 (0,21) *	4,98 (0,25)*	3,21 (0,15) *	1,20 (0,04) *
<i>A. marmoreus</i>	♀	4,82 (0,06) *	5,87 (0,10)*	3,78 (0,06) *	1,48 (0,01) *	4,48 (0,08) *	5,30 (0,10)*	3,40 (0,06) *	1,39 (0,02) *
	♂	5,06 (0,15) *	6,14 (0,19)*	3,75 (0,12) *	1,34 (0,03) *	4,47 (0,14) *	5,36 (0,16)*	3,34 (0,11) *	1,24 (0,03) *

В целом комбинация линейных размеров тела исследованных видов пауков отличается как между полами, так и между видам (PERMANOVA, $N = 9999$, $F = 42.53$, $p = 0.0001$), при этом попарное сравнение (использована поправка Бонферрони) не находит значимого различия ($p = 0.37$) только между самцами *A. diadematus* и *A. marmoreus*. Анализ главных компонент (PCA) хорошо различает самцов и самок, при этом первая главная ось (74 % дисперсии) является сочетанием переменных общей длины тела и размеров брюшка (рис. 3.1). Все размеры головогруди скоррелированы между собой и объясняют рассеяние точек относительно второй главной оси (19 % дисперсии). Попарное сравнение (в качестве модели выбран *A. marmoreus*, рис. 3.2) с помощью U-критерия Манна-Уитни показывает

отсутствие статистически значимых различий между длиной головогруды самцов и самок ($U = 2627$, $p = 0,06$), при этом размеры брюшка значимо различаются между полами ($U = 84$, $p < 0,05$). Обращает на себя внимание и размах изменчивости размеров брюшка самок. С одной стороны, такая вариабельность имеет чисто техническое объяснение: при хранении в спирте брюшко пауков, не являющееся в отличие от головогруды и конечностей сильно хитинизированной структурой, может менять размер. С другой стороны, крупное брюшко самок увеличивает репродуктивный успех, при этом часто в популяциях наблюдается две группы самок: относительно некрупные, быстрее достигающие половой зрелости, но не способные пережить зиму и крупные, развивающиеся позднее, но способные к откладке яиц после зимней диапаузы [3]. При этом размер брюшка самцов более стабилен при меньших абсолютных значениях. По-видимому, отбор, действующий на самцов кругопрядов, носит характер стабилизирующего: самцы с небольшим брюшком могут быстрее достичь половой зрелости и быть более маневренными при поиске самки [15].

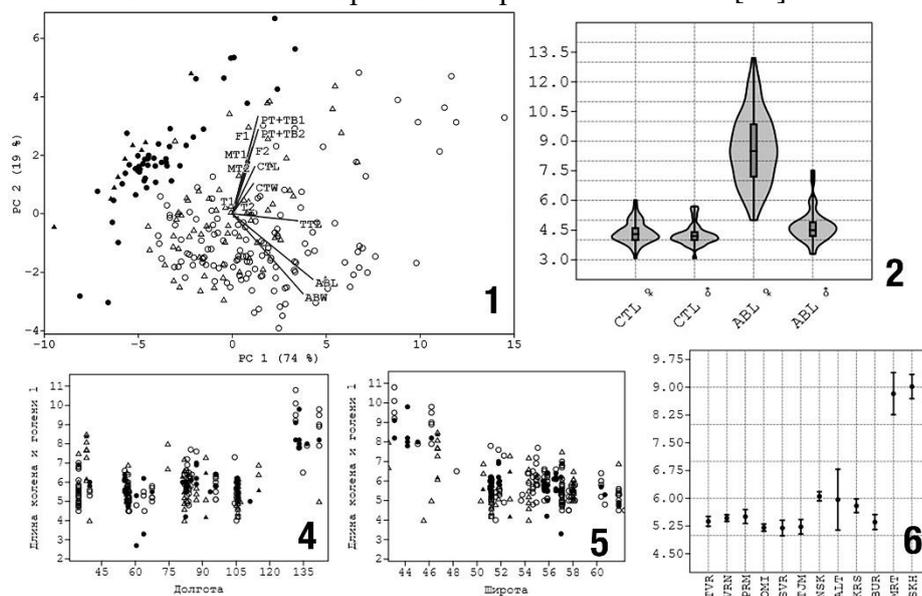


Рисунок 3. 1 – Биplot главных компонент (PCA) изменчивости линейных размеров *A. diadematius* и *A. marmoreus*, обозначения факторов как на рисунке 1. 2 – Сравнение длины головогруды (CTL) и брюшка (ABL) самок и самцов *A. marmoreus*. 4,5. Диаграмма рассеяния значений длины колена и голени 1 пары ног *A. diadematius* и *A. marmoreus* относительно долготы (4) и широты (5) места сбора. Круг – *A. marmoreus*, треугольник – *A. diadematius*. Темная заливка – самцы, светлая заливка – самки. 6. Средние значения и стандартные отклонения длины колена и голени 1 пары ног самок *A. marmoreus*, ось X – регионы сбора (ALT – Алтайский кр., BUR – Респ. Бурятия, КОМ – Респ. Коми, KRD – Краснодарский кр., Ростовская обл., KRG – Чуйская обл., KRS – Красноярский кр., MRT – Приморье, NSK – Новосибирская обл., PRM – Пермский кр., SKH – Сахалинская обл., SVR – Свердловская обл., TJM – Тюменская обл., TVR – Тверская обл., VKO – Восточно-Казахстанская обл., VRN – Воронежская обл.).

Выяснение структуры рассеяния точек на биplotе главных компонент (рис. 3) показало существование определенной группировки точек относительно места сбора материала (подписи точек не показаны на рисунке для сохранения его читаемости). Различия между дисперсиями значений размеров в разных географических популяциях подтверждается многомерным дисперсионным анализом (в качестве группирующей переменной использованы регионы сбора материала) PERMANOVA ($N = 9999$, $F = 6,35$, $p = 0.0001$). Попарное сравнение (использована поправка Бонферрони) показывает, что экземпляры из Приморья и с о-ва Сахалин (MRT, SKH, рисунок 3.6) отличаются от

остальных точек сбора, при этом между этими видами различий не обнаружено ($F = 1,15$, $p = 1$). Проверка на наличие тренда (тест Манна-Кендалла) показала наличие тренда к уменьшению размеров по мере движения к высоким широтам (для колена и голени 1 ног $Z = -6,55$, $p < 0,05$), что видно на диаграмме рассеяния значений промеров (рисунок 3.5) и к возрастанию с запада к востоку ($Z = 3,43$, $p < 0,05$). Интерпретацию долготной изменчивости (и резких различий в размерах пауков популяций Приморья и Сахалина) осложняет то, что между переменными долготы и широты в анализированном наборе данных выявлена корреляция ($r_s = 0,67$, $p < 0,05$), являющаяся артефактом данных. Скорее всего, значительные отличия дальневосточных пауков – следствие сочетания воздействия факторов, связанных с широтой и мягкостью климата. Таким образом, распределение размеров двух исследованных видов является примером анти-Бергмановской клинальной изменчивости. Для пауков-кругопрядов характерна постройка убежищ, поэтому прямое влияние температуры как главного фактора, объясняющего географическую изменчивость, вряд ли подходит для этой группы.

Возможным объяснением данного тренда может быть как увеличение количества доступной пищи, позволяющее достигать большего размера, так и увеличение продолжительности вегетационного периода. Похожая изменчивость обнаружена и у пауков-волков сем. Lycosidae [10]. Вероятно, анти-Бергмановская клина может претендовать на роль универсального паттерна географической изменчивости размеров пауков, т.к. обнаружена и у тенетных, и у бродячих пауков (однако в мире существует ещё 126 семейств пауков [9], поэтому вряд ли можно сказать, что это мнение является окончательным).

Библиографический список

1. Шкурихин, А.О., Е.Ю. Захарова, Т.С. Ослина, И. А. Солонкин. 2018. “Изменчивость морфофизиологических признаков самцов и самок *Aporia crataegi* L. (Lepidoptera: Pieridae) в зависимости от времени вылета имаго, “Экология.” Экология, no. 4: 325–30. <https://doi.org/10.7868/s036705971804011x>.
2. Luca, Paul A. De, Stephen Buchmann, Candace Galen, Andrew C. Mason, and Mario Vallejo-Marín. 2019. “Does Body Size Predict the Buzz-Pollination Frequencies Used by Bees?” *Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1002/ece3.5092>.
3. Anotaux, M., J. Marchal, N. Châline, L. Desquilbet, R. Leborgne, C. Gilbert, and A. Pasquet. 2012. “Ageing Alters Spider Orb-Web Construction.” *Animal Behaviour* 84 (5): 1113–21. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.08.017>.
4. Kuntner, Matja, Chris A. Hamilton, Ren Chung Cheng, Matja Gregorič, Nik Lupše, Tjaša Lokovšek, Emily Moriarty Lemmon, et al. 2019. “Golden Orbweavers Ignore Biological Rules: Phylogenomic and Comparative Analyses Unravel a Complex Evolution of Sexual Size Dimorphism.” *Systematic Biology* 68 (4): 555–72. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy082>.
5. Blackburn, Tim M, Kevin J Gaston, and Natasha Loder. 1999. “Geographic Gradients in Body Size: A Clarification of Bergmann’s Rule.” *Diversity and Distributions* 5 (4): 165–74. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.1999.00046.x>.
6. Nwaogu, Chima J., B. Irene Tieleman, Kwanye Bitrus, and Will Cresswell. 2018. “Temperature and Aridity Determine Body Size Conformity to Bergmann’s Rule Independent of Latitudinal Differences in a Tropical Environment.” *Journal of Ornithology*. <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1574-8>.
7. Goodman, Rae E., Gretchen Lebuhn, Nathaniel E. Seavy, Thomas Gardali, and Jill D. Bluso-Demers. 2012. “Avian Body Size Changes and Climate Change: Warming or Increasing Variability?” *Global Change Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02538.x>.

8. Shelomi, Matan. 2012. “Where Are We Now? Bergmann’s Rule Sensu Lato in Insects.” *American Naturalist*. <https://doi.org/10.1086/667595>.
9. World Spider Catalog. 2020. “World Spider Catalog (2020).” Version 21.5, Natural History Museum Bern., 2020. <https://doi.org/10.24436/2>.
10. Puzin, Charlene, Boris Leroy, and Julien Pétillon. 2014. “Intra- and Inter-Specific Variation in Size and Habitus of Two Sibling Spider Species (Araneae: Lycosidae): Taxonomic and Biogeographic Insights from Sampling across Europe.” *Biological Journal of the Linnean Society* 113 (1): 85–96. <https://doi.org/10.1111/bij.12303>.
11. Ihara, Y. 2008. “Species Diversity and Geographic Differentiations of Reproductive Organs and Body Size in the Genus *Cybaeus* (Araneae: Cybaeidae) in Japan.” *Acta Arachnologica*. <https://doi.org/10.2476/asjaa.57.87>.
12. Ihara, Yoh. 2007. “Geographic Variation and Body Size Differentiation in the Medium-Sized Species of the Genus *Cybaeus* (Araneae: Cybaeidae) in Northern Kyushu, Japan, with Descriptions of Two New Species.” *Acta Arachnologica* 56 (1): 1–14.
13. Spasojevic, Tamara, Christian Kropf, Wolfgang Nentwig, and Liana Lasut. 2016. “Combining Morphology, DNA Sequences, and Morphometrics: Revising Closely Related Species in the Orb-Weaving Spider Genus *Araniella* (Araneae, Araneidae).” *Zootaxa*. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4111.4.6>.
14. Hammer, Øyvind, David A.T. Harper, and Paul D. Ryan. 2001. “Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis.” *Palaeontologia Electronica*.
15. Михайлов, К. Г. 2012. *Общая Арахнология. Краткий Курс. Часть 2. Пауки: Морфология, Анатомия, Биология. Товарищество научных изданий КМК Москва.*

ВЛИЯНИЕ *RHODOCOCCLUS*-БИОСУРФАКТАНТОВ НА ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ СЕМЯН РАСТЕНИЙ К ИОНАМ ЦИНКА

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

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

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

Аннотация. Исследовано влияние гликолипидных *Rhodococcus*-биосурфактантов на эффективность прорастания семян сельскохозяйственных культур растений: вики полевой (*Vicia sativa* L.), горчицы белой (*Sinapis alba* L.) и овса посевного (*Avena sativa* L.) в присутствии цинка. Установлено, что цинк в концентрациях ≥ 10 ПДК оказывает выраженное угнетающее действие на прорастание семян. Обработка семян *Rhodococcus*-биосурфактантами способствует ослаблению негативного влияния цинка за счёт десорбции ионов Zn^{2+} с последующим образованием стабильных комплексов “биосурфактант-металл”. Обнаружена прямая зависимость между обработкой семян тестовых растений эмульсией *Rhodococcus*-биосурфактантов и повышением энергии их прорастания в 2-х раза, всхожести и стимуляции роста корней и побегов проростков в более, чем 10 раз в присутствии цинка. Полученные сведения могут быть использованы при разработке экологически безопасного способа снижения токсического влияния цинка на рост сельскохозяйственных культур растений в присутствии *Rhodococcus*-биосурфактантов.

Ключевые слова: *Rhodococcus*-биосурфактанты, сельскохозяйственные растения, тяжёлые металлы, цинк

Работа поддержана госзаданием (госрегистрация темы: АААА-А19-119112290008-4), РНФ (номер гранта 18-14-00140) и МИГ (соглашение № С-26/174.1).

Введение. Одной из острых экологических задач является разработка современных безопасных методов извлечения тяжелых металлов (ТМ) и технологий очистки почв от ТМ загрязненных территорий. Основным источником попадания ТМ в окружающую природную среду – промышленные выбросы [1,2]. ТМ аккумулируются чаще всего в верхних гумусовых горизонтах почвы. Период полуудаления (то есть удаления половины от начальной концентрации) их из почвы занимает весьма продолжительное время: для цинка – от 70 до 510 лет, меди – от 310 до 1500 лет, свинца – 770 до 5900 лет. На фоне антропогенной деятельности очевиден все возрастающий прессинг техногенных потоков ТМ на лесные экосистемы, сельскохозяйственные угодья и сельскохозяйственные культуры.

К ТМ относят более 40 химических элементов, характеризующихся различной степенью распространенности, токсичности, способностью к накоплению в живых организмах. Многие металлы образуют стойкие органические соединения, хорошая растворимость этих комплексов способствует миграции ТМ в природных водах.

Цинк – четвертый (после железа, алюминия и меди) в мире по использованию металл – относится к классу умеренно опасных веществ. Токсическое действие высоких концентраций цинка на растения проявляется в нарушении поступления и распределения макро- и микроэлементов, а также в уменьшении количества и длины корней [3,4]. Выступая в качестве антагониста железа, цинк вызывает хлороз растений, при этом уменьшается поглощение железа, а также содержание пигментов, снижающих активность фотосистемы II растений. Накопление высоких концентраций цинка в растениях приводит к частичному закрыванию устьиц и уменьшению площади устьичной щели, что влияет на замедление скорости фотосинтеза и тормозит рост и развитие побегов [5].

В настоящее время для очистки почвы, загрязненной ТМ, все чаще рекомендуется использование методов фиторемедиации в комплексе с сурфактантами биогенного происхождения. Данный подход позволит эффективно очищать почвы даже при высоком (50 ПДК и более) уровне их загрязнения ТМ. Эффективность применения *Rhodococcus*-биосурфактантов для снижения фитотоксичности некоторых ТМ была показана нами ранее [6,7,8].

Цель настоящего исследования – оценка влияния *Rhodococcus*-биосурфактантов на фитотоксичность ионов цинка.

Материалы и методы. В сравнительных экспериментах изучено влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов (в концентрациях 2,0, 4,0 и 8,0 г/л) на фитотоксичность сульфата цинка ($ZnSO_4 \times 7H_2O$, ч.д.а.) в отношении всхожести семян растений: овса посевного (*Avena sativa* L.), горчицы белой (*Sinapis alba* L.) и вики полевой (*Vicia sativa* L.). Уровень фитотоксичности определяли в соответствии со стандартными Методическими рекомендациями МР 2.1.7.2297-07 [9]. Эксперименты по определению фитотоксичности проводили в лаборатории на базе учебного Ботанического сада Пермского государственного национального исследовательского университета. Условия проращивания: подсветка белыми люминесцентными лампами, спектр которых максимально приближен к дневному свету; температура 23–25°C; pH среды проращивания семян 6,3–6,5. Растворы соли цинка вносили в количестве 1, 10, 50, 100 и 200 ПДК с учетом фона по CLARC, что составляло в пересчете на чистый металл 23, 230, 1150, 2300 и 4600 мг/кг почвы, соответственно [10]. Содержание металла рассчитывали на основании атомных масс.

В работе использовали штамм актинобактерий *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, № 285 во Всемирной федерации коллекций культур; <http://www.iegmcoll.ru>; реестровый номер УНУ 73559). Бактериальную культуру выращивали в среде RS (*Rhodococcus* Surfactant) на орбитальном шейкере в течение 7 сут (160 об./мин, 28°C). Состав среды RS (г/л): Na₂HPO₄ – 2.0; KH₂PO₄ – 2.0; KNO₃ – 1.0; (NH₄)₂SO₄ – 2.0; NaCl – 1.0; MgSO₄×7H₂O – 0.2; CaCl₂×2H₂O – 0.02; FeCl₃×7H₂O – 0.01 [11]. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали *n*-додекан (C₁₂) либо *n*-гексадекан (C₁₆) в концентрации 3 об.%. В качестве источника витаминов и фактора роста добавляли раствор микроэлементов по Пфеннигу – 1.0 мл/л и 10 %-ный дрожжевой экстракт – 1.0 мл/л. Неочищенные биосурфактантные комплексы гликолипидной природы, продуцируемые родококками при росте на жидких углеводородах, получали методом [12]. Предварительную обработку семян препаратами биосурфактантов осуществляли в течение 30 мин, после чего проводили эксперименты по фитотоксичности цинка. В каждую чашку Петри помещали по 25 сухих здоровых семян и вносили по 5 мл водного раствора неочищенных биосурфактантов и сульфата цинка. Энергию прорастания определяли на 3- и сут, всхожесть и длину проростков – на 7-и сут эксперимента. В качестве контроля использовали дистиллированную воду, водные растворы биосурфактантов и сульфата цинка. В тексте статьи для условного обозначения биосурфактантов, продуцируемых родококками в жидкой минеральной среде с *n*-додеканом, нами использована аббревиатура БС C₁₂; для биосурфактантов, продуцируемых родококками в среде с *n*-гексадеканом, – БС C₁₆. При статистической обработке полученных результатов использовали стандартные методы с вычислением среднего арифметического, стандартной ошибки, среднеквадратичного отклонения и доверительного интервала с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel 2007. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Результаты. Исследовано влияние ионов Zn²⁺ на прорастание семян сельскохозяйственных растений в присутствии *Rhodococcus*-биосурфактантов. Энергия прорастания семян после обработки их биосурфактантами возрастала до 2-х раз по сравнению с таковой в условиях прорастания семян без обработки в среде, загрязненной цинком (рис. 1). Данная закономерность сохранялась во всех вариантах эксперимента.

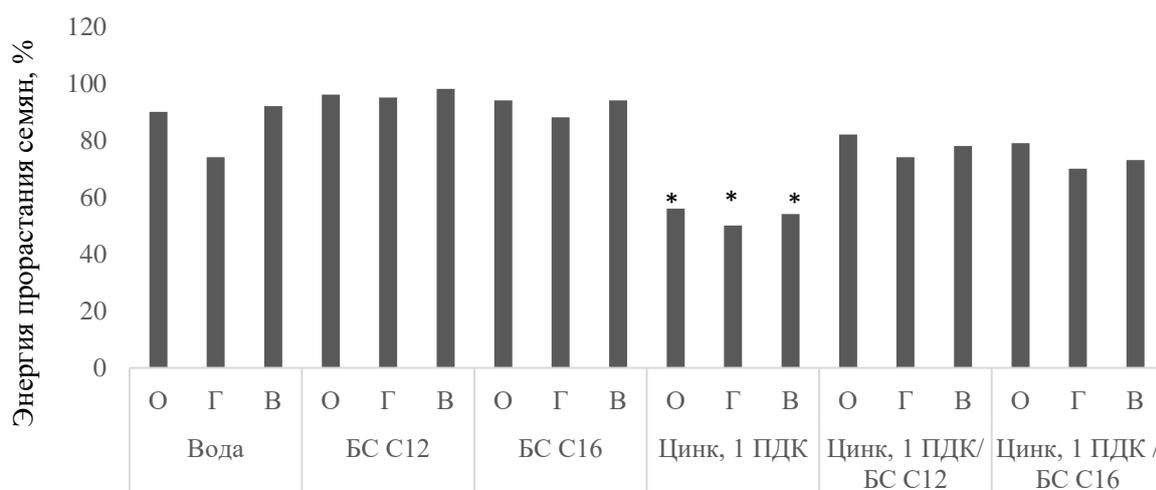


Рис. 1. Влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов (БС) на энергию прорастания семян: О – овёс посевной, Г – горчица белая, В – вика полевая; * – статистически достоверно ($p < 0.05$).

В табл. 1 показано влияние ионов Zn²⁺ на длину побегов и корней овса, горчицы и вики в присутствии БС C₁₂. Семена горчицы белой после обработки биосурфактантом

прорастали при концентрации цинка в среде до 200 ПДК. Следует отметить ингибирование прорастания корней и побегов у вики полевой в присутствии ионов Zn^{2+} в концентрациях ≥ 10 ПДК, тогда как после обработки биосурфактантами её семена прорастали в условиях загрязнения цинком в концентрациях до 50 ПДК. После предварительной обработки семян БС С₁₂ длина корней у тестовых растений увеличивалась до 11.1, побегов – до 4.0 раз.

Таблица 1

Влияние цинка на длину побегов и корней проростков в присутствии БС С₁₂, мм

Варианты опыта	Овес посевной		Горчица белая		Вика полевая	
	Длина побега	Длина корня	Длина побега	Длина корня	Длина побега	Длина корня
Контроль	20.7±2.49	27.3±4.27	25.3±7.40	30.4±8.10	14.1±4.70	13.0±3.50
Zn ²⁺ 1 ПДК	22.5±2.71	25.1±2.55	8.9±2.86	15.3±2.06	2.9±0.99	8.2±2.81
Zn ²⁺ 10 ПДК	9.3±2.65	15.0±1.91	7.3±2.16	10.4±2.63	–	4.6±1.89
Zn ²⁺ 50 ПДК	3.0±1.15	6.2±2.93	–	3.7±1.19	–	–
Zn ²⁺ 100 ПДК	–	–	–	2.7±0.90	–	–
Zn ²⁺ 200 ПДК	–	–	–	–	–	–
БС, 2 г/л	29.4±18.00	21.8±10.20	37.0±33.79	22.5±11.82	20.1±2.60	18.2±2.99
БС, 4 г/л	4.3±2.29	–	22.2±18.70	21.7±8.96	9.5±1.86	9.31±3.40
БС, 8 г/л	30.1±15.20	4.0±2.00	20.6±15.00	26.2±8.00	7.0±1.98	–
1 ПДК / 2 г/л	29.7±1.72	32.0±2.31	39.2±4.26	39.1±3.78	6.5±2.56	13.9±2.33
1 ПДК / 4 г/л	39.5±4.10	42.8±2.65	50.6±8.60	54.8±8.60	12.4±3.98	20.3±3.10
1 ПДК / 8 г/л	26.3±2.21	27.7±3.45	41.0±3.75	33.9±6.92	4.8±2.04	8.0±2.68
10 ПДК / 2 г/л	16.6±2.07	20.0±1.29	26.0±2.27	22.3±3.03	2.7±0.90	14.3±1.80
10 ПДК / 4 г/л	25.0±3.41	26.8±4.70	32.3±3.53	34.8±8.48	5.7±2.65	11.9±2.13
10 ПДК / 8 г/л	34.5±1.60	49.7±2.60	22.8±3.14	24.8±1.88	–	7.4±3.26
50 ПДК / 2 г/л	9.2±3.07	15.5±2.48	12.5±3.10	21.8±2.25	–	–
50 ПДК / 4 г/л	14.5±2.37	21.4±2.82	21.1±2.43	26.3±3.91	–	–
50 ПДК / 8 г/л	5.6±1.81	9.0±2.00	9.7±1.29	18.8±14.07	–	–
100 ПДК / 2 г/л	–	–	4.9±1.87	7.0±2.41	–	–
100 ПДК / 4 г/л	–	–	11.7±2.80	15.0±2.46	–	–
100 ПДК / 8 г/л	–	–	4.0±1.44	6.5±2.42	–	–
200 ПДК / 2 г/л	–	–	2.9±1.35	3.0±1.03	–	–
200 ПДК / 4 г/л	–	–	4.3±1.41	5.5±1.91	–	–
200 ПДК / 8 г/л	–	–	2.6±1.19	3.8±1.71	–	–

Примечание. В графе “Вариант эксперимента” представлены использованные в работе растворы в виде концентрации ионов цинка, ПДК / *Rhodococcus*-биосурфактантов, г/л. Угнетение роста корней и побегов “–”.

Наиболее высокая (98 %) всхожесть семян овса посевного выявлена в присутствии ионов Zn^{2+} в концентрации 1–10 ПДК, тогда как в присутствии ионов цинка в концентрации 50 ПДК проросло лишь 66% семян овса (рис. 2). Использование предварительной обработки семян овса биосурфактантами приводило к повышению до 2 раз их всхожести в среде, загрязненной цинком, по сравнению с таковой без обработки. Следует отметить, что обработка семян БС С₁₆ способствовала прорастанию семян в условиях загрязнения среды цинком в концентрации 200 ПДК.

Аналогичная тенденция наблюдалась в экспериментах по изучению влияния Zn^{2+} на длину проростков в присутствии БС С₁₆ (табл. 2). При этом следует отметить, что

обработанные биосурфактантом семена овса прорастали в присутствии цинка в концентрации 200 ПДК.

Таблица 2

Влияние цинка на длину побегов и корней проростков в присутствии БС С₁₆, мм

Вариант эксперимента	Овес посевной		Горчица белая		Вика полевая	
	Длина побега	Длина корня	Длина побега	Длина корня	Длина побега	Длина корня
Контроль	20.7±2.49	27.3±4.27	13.3±3.76	10.5±4.16	14.1±4.71	13.0±3.57
БС, 2 г/л	39.5±26.03	41.8±21.30	30.5±11.13	33.6±26.35	10.2±0.84	–
БС, 4 г/л	13.5±7.00	23.9±13.50	27.9±8.74	33.8±20.08	4.8±1.71	–
БС, 8 г/л	31.9±19.31	35.4±18.30	20.5±7.40	40.2±29.76	6.8±1.71	–
1 ПДК / 2 г/л	36.5±20.81	39.1±21.60	20.2±4.18	13.8±9.63	–	–
1 ПДК / 4 г/л	33.7±23.65	41.7±21.80	23.1±6.20	22.4±19.21	6.0±1.00	–
1 ПДК / 8 г/л	39.2±22.86	51.0±21.70	17.2±7.90	15.5±12.72	–	–
10 ПДК / 2 г/л	43.1±34.58	34.6±19.20	18.3±8.12	10.8±9.44	4.0±2.00	–
10 ПДК / 4 г/л	30.3±14.00	23.1±9.54	13.1±3.51	7.4±4.65	8.3±3.21	–
10 ПДК / 8 г/л	17.4±9.28	18.3±7.96	14.2±5.61	16.9±6.41	–	–
50 ПДК / 2 г/л	20.4±9.05	8.1±3.70	10.7±4.30	4.0±0.30	7.5±0.71	–
50 ПДК / 4 г/л	27.3±9.59	10.0±4.12	7.6±3.31	–	–	–
50 ПДК / 8 г/л	19.4±6.18	8.3±3.55	9.4±3.74	–	–	–
100 ПДК / 2 г/л	19.1±5.10	4.1±1.41	–	–	–	–
100 ПДК / 4 г/л	21.7±6.86	9.2±4.92	5.2±0.75	–	–	–
100 ПДК / 8 г/л	25.7±4.96	–	–	–	–	–
200 ПДК / 2 г/л	11.6±3.89	5.2±1.83	–	–	–	–
200 ПДК / 4 г/л	12.5±4.65	6.3±1.86	–	–	–	–
200 ПДК / 8 г/л	13.5±3.11	–	–	–	–	–

Примечание. В графе «Вариант эксперимента» представлены используемые в работе растворы в виде концентрации ионов цинка, ПДК / *Rhodococcus*-биосурфактантов, г/л. Угнетение роста корней и побегов “–”.

Как видно из рис. 3, до 88 % семян горчицы белой после обработки их БС С₁₂ прорастали даже в условиях загрязнения среды цинком в концентрации 200 ПДК. Количество проросших семян при обработке их биосурфактантами в целом на 30–100% выше, по сравнению с таковым без обработки.

Прорастание семян вики полевой в присутствии сульфата цинка в концентрации 10 ПДК составило 76%, тогда как более высокие концентрации ионов Zn²⁺ ингибировали всхожесть семян (рис. 4). Всхожесть семян *Vicia sativa* L. после обработки их биосурфактантами способствовало прорастанию семян в условиях загрязнения цинком в концентрации 50 ПДК.

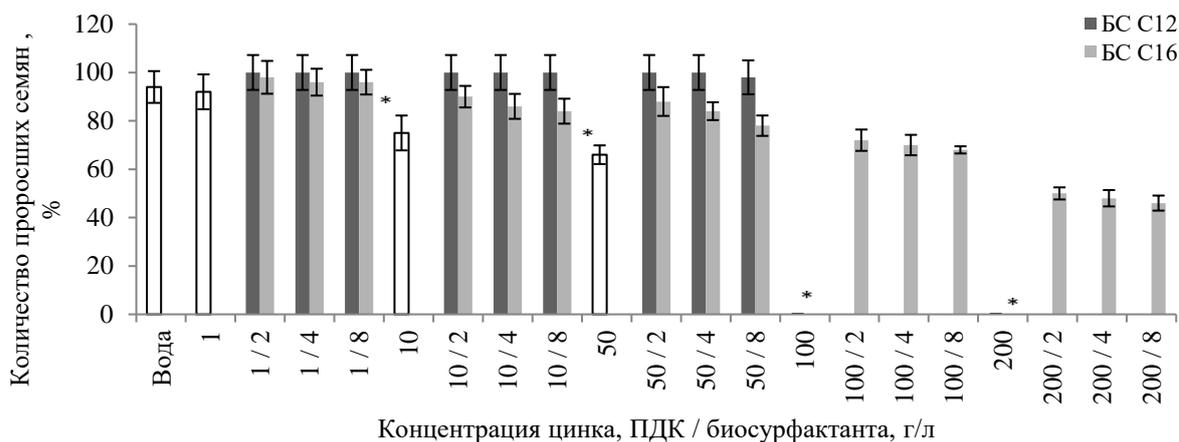


Рис. 2. Влияние биосурфактантов (БС) на всхожесть семян *Avena sativa* L. в присутствии ионов цинка (ПДК, мг/кг почвы). *Статистически достоверно ($p < 0.05$) от *Rhodococcus*-биосурфактантов.

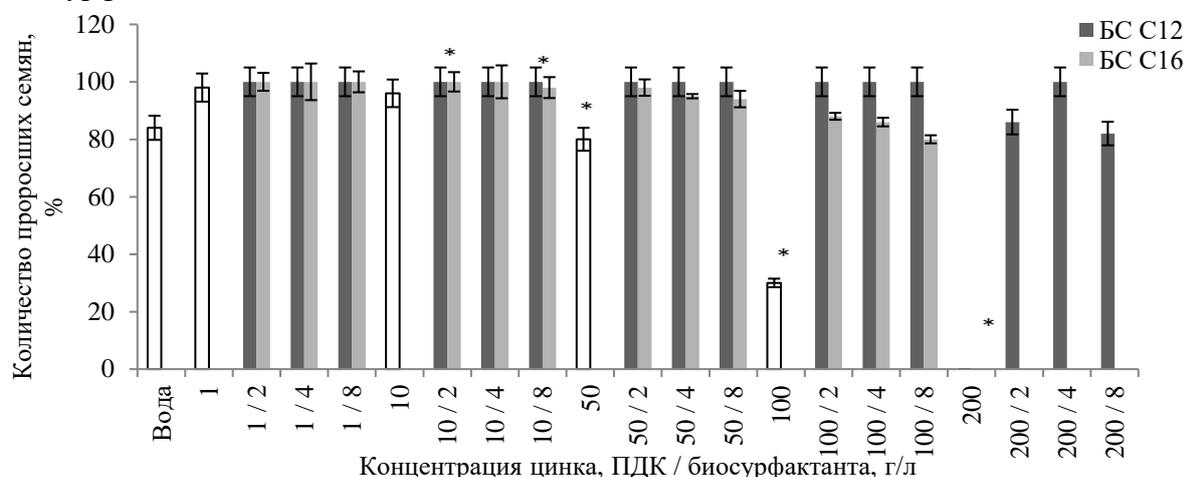


Рис. 3. Влияние биосурфактантов (БС) на всхожесть семян *Sinapis alba* L. в присутствии ионов цинка (ПДК, мг/кг почвы). *Статистически достоверно ($p < 0.05$) от *Rhodococcus*-биосурфактантов.

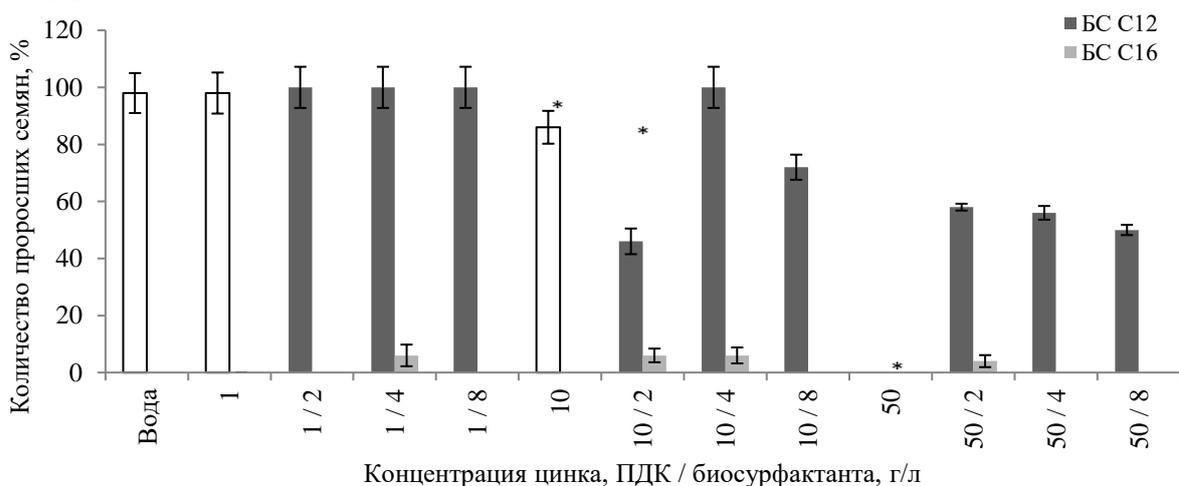


Рис. 4. Влияние биосурфактантов (БС) на всхожесть семян *Vicia sativa* L. в присутствии ионов цинка (ПДК, мг/кг почвы). *Статистически достоверно ($p < 0.05$) от *Rhodococcus*-биосурфактантов.

Выводы. В результате проведенных исследований выявлено положительное влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов на прорастание семян сельскохозяйственных культур растений: *Avena sativa* L., *Sinapis alba* L. и *Vicia sativa* L. в условиях загрязнения цинком. Наиболее устойчивыми тестовыми растениями к действию ионов Zn^{2+} в условиях предварительной обработки семян БС С₁₂ оказались горчица белая, в условиях предварительной обработки семян БС С₁₆ – овёс посевной. Предварительная обработка семян сельскохозяйственных растений *Rhodococcus*-биосурфактантами существенно снижает фитотоксичность ионов цинка, а также способствует улучшению кондиционных свойств семян.

Работа поддержана госзаданием (госрегистрация темы: АААА-А19-119112290008-4), РФФИ (номер гранта 18-14-00140) и МИГ (соглашение № С-26/174.1).

Библиографический список

1. Водяницкий Ю.Н., Кириллова Н.П. Загрязнение почв и растений эмерджентными микрополлютантами // *Агрохимия*. – 2016. – № 5. – С. 86–94.
2. Гладков Е. А. Тяжелые металлы как одни из основных загрязнителей почвенного покрова города Москвы // *Auditorium*. – 2018. – № 2. – С. 1(4).
3. Mandal M.K., Saikia P., Chanu Ng.K., Chaurasia N. Modulation of lipid content and lipid profile by supplementation of iron, zinc, and molybdenum in indigenous microalgae // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2019. – V. 26(20). – P. 20815–20828.
4. Pinto E., Aguiar A.A.R.M., Ferreira I.M.P.L.O. Influence of soil chemistry and plant physiology in the phytoremediation of Cu, Mn, and Zn. // *Critical reviews in plant science*. – 2014. – V. 33. – P. 351–373.
5. Казнина Н.М., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф., Титов А.Ф. Влияние цинка на рост и фотосинтетический аппарат растений пшеницы в условиях оптимума и гипотермии // *Труды Карельского научного центра РАН*. – 2017. – № 12. – С. 118–124.
6. Tishchenko A.V., Litvinenko L.V., Shumikhin S.A. Effects of Rhodococcus-biosurfactants on the molybdenum ion phytotoxicity // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – 2019. – V. 487(1). – P. 1–6.
7. Litvinenko L.V., Tishchenko A.V., Ivshina I.B. Reduction of copper ion phytotoxicity using Rhodococcus-biosurfactants // *Biology Bulletin*. – 2019. – V. 46(10). – P. 135–140.
8. Литвиненко Л.В., Тищенко А.В. Изучение фитотоксичности никеля в присутствии *Rhodococcus*-биосурфактантов // *Вестник Удмуртского Университета. Серия Биология. Науки о Земле*. – 2019. – Вып. 1. – С. 71–79.
9. МР 2.1.7.2297-07. Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности [Электронный ресурс]. – 2007. URL:http://www.ohranatruda.ru/ot_biblio/normnorm/data_normativ/52/52957/.
10. ГН 2.1.7.2041-06. – Почва, очистка населенных мест, отходы производства и потребления, санитарная охрана почвы. Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве [Электронный ресурс]. – 2006. URL:http://www.gosthelp.ru/text/GN217204106_Predelnodopust.html.
11. Ivshina I.B. Kuyukina M.S., Philp J.C. & Christofi N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – V. 14. – P. 711–717.
12. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl-tertiary butyl ether extraction // *J. Microbiol. Methods*. – 2001. – V. 46. – P. 149–156.

ВЛИЯНИЕ РЯДА АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Триандафилова Г. А.¹, Смирнова Г. В.¹, Ботева А. А.², Октябрьский О.Н.¹

¹ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН - филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

²ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, скорость роста, азотсодержащие гетероциклы, минимальная ингибирующая концентрация

Микробиом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека содержит около 10^8 микроорганизмов, большая часть которых является бактериями. Они играют важную роль в пищеварении, секреции полезных метаболитов, в том числе витаминов К и группы В, а также участвуют в формировании иммунитета. Изменения в биоразнообразии микробиома ЖКТ связаны с такими заболеваниями, как атопический дерматит, аутоиммунный энцефаломиелит, колоректальный рак, воспаление кишечника, ожирение печени, воспалительное заболевание кишечника, ожирение, диабет и ревматоидный артрит [1, 2]. Показано, что на биоразнообразии микробиома могут оказывать влияние применяемые лекарственные препараты. Так, исследование действия более чем 1000 неантибиотических лекарственных препаратов на 40 представителей микробиома кишечника показало, что 24% лекарственных средств ингибировало рост бактерий [3]. Биотрансформация лекарственных препаратов с участием микроорганизмов ЖКТ может влиять на их фармакокинетические и фармакодинамические параметры. Примером положительной биотрансформации могут служить азо-содержащие противовоспалительные препараты (сульфасалазин и др.), когда под действием микроорганизмов происходит превращение неактивных предшественников (пролекарств) в активные субстанции [4]. К отрицательной биотрансформации можно отнести случай с увеличением токсичности препаратов (нитразепама и кетопрофена) или инактивации (дигоксина) при действии бактериальных ферментов [5, 6].

Среди лекарственных препаратов, обладающих анальгетическим или антигипоксическим действием, широко представлены гидрокси- и оксопроизводные азотсодержащих гетероциклических соединений. Был установлен ряд перспективных веществ, относящихся к данному классу и классу их ациклических предшественников, которые обладают анальгетической или антигипоксической активностью, либо их комбинацией.

Целью исследования было изучение влияния ряда оксопроизводных азотсодержащих гетероциклических соединений (ОАГС) на ростовые характеристики бактерий *Escherichia coli*.

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) проводили в 96-луночных планшетах с использованием штамма *E. coli* BW25113. Выращивание бактерий проводили на минимальной среде М9 при 37 °С. Рост бактерий оценивали по изменению оптической плотности через 18-22 часа после внесения веществ, измерение оптической плотности проводили на микропланшетном спектрофотометре BioRad xMark™ (США) при длине волны 600 нм, либо визуально при наличии осадка исследуемого вещества. ОАГС растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Установлено, что 25 веществ не ингибировали рост бактерий в тех максимальных концентрациях, которые удалось достичь в пределах их растворимости в ДМСО. Для семи соединений МИК была определена (Таблица 1).

Таблица 1

Минимальная ингибирующая концентрации исследуемых соединений

Шифр соединения	МИК, мМ	Шифр соединения	МИК, мМ
CBR-350	>4	CBR-292	> 0,125
CBR-76	>5	CBR-41	>4
CBR-366	>10	CBR-383	> 0,125
CBR-367	>4	CBR-352	= 0,5
CBR-368	>2	CBR-379	>2
CBR-369	>2	CBR-266	>4
CBR-370	>4	CBR-324	>4
CBR-371	= 1	CBR-288	= 1
CBR-372	> 1	CBR-123	>4
CBR-373	> 1	CBR-124	>4
CBR-374	> 1	CBR-125	>4
CBR-272	>4	CBR-382	>4
CBR-375	= 4	CBR-384	= 0,5
CBR-376	= 0,25	CBR-385	>0,125
CBR-160A	> 1	CBR-386	= 0,25
CBR-11	> 0,25	CBR-64	>0,5

Для исследования влияния ОАГС на скорость роста штамма BW25113 были выбраны 8 соединений, относящихся к 3 различным структурным группам.

Культуру в экспоненциальной фазе роста вносили к исследуемым веществам в лунки 96-луночного планшета. Инкубирование проводили при 37°C в термошейкере ELMi Ltd Sky Line ST-3L (Латвия) при 150 об/мин. Оптическую плотность измеряли на микропланшетном спектрофотометре каждые 15 минут в течение двух часов. Вещества CBR-384, CBR-386 и CBR-376 исследовали в концентрациях, равных МИК и 1/10 МИК. Для остальных соединений исследование проводили в максимально возможной концентрации, в которой не наблюдалось выпадение осадка. В качестве контроля в лунки добавляли эквивалентный объем растворителя ДМСО.

При выращивании *E. coli* в 96-луночном планшете можно выделить 3 стадии роста: 1 – экспоненциальный рост (0 – 30 минут); 2 – снижение скорости роста, адаптация к микроаэробным условиям (30 – 60 минут); 3 – рост в микроаэробных условиях (60 – 120 минут). Было установлено, что исследуемые соединения по-разному влияют на скорость роста бактерий в зависимости от стадии роста.

Соединения CBR-384, CBR-386 и CBR-288 являются близкими структурными аналогами, которые отличаются друг от друга тем, что имеют в одном и том же положении гетероциклической системы на основе 1,4-бензоксазина трет-бутильный, метильный и п-фторфенильный заместители соответственно. Соединение CBR-386 имело меньшее значение МИК по сравнению с двумя другими аналогами, при этом немного снижало скорость роста бактерий в растущей культуре. Соединение CBR-384 значительно снижало скорость роста в экспоненциальной фазе, при этом рост увеличивался до контрольных значений к моменту перехода к микроаэробным условиям. Соединение CBR-288 быстрее снижало скорость роста при переходе к микроаэробным условиям (рис. 1. А).

Соединения CBR-124, CBR-125 и CBR-382 также являются близкими структурными аналогами. Соединения CBR-124 и CBR-125, оба – замещенные пиперазины, не оказывали

влияния на скорость роста бактерий, а CBR-382, замещенный 1,4-оксазин, достоверно уменьшал скорость роста бактерий при переходе в микроаэробные условия (рис. 1. Б).

Соединения CBR-376 и CBR-11, в основе которых лежит 4-хинолоновый фрагмент, оказывали незначительное действие, снижая скорость роста бактерий в начале экспоненциальной фазы (рис. 1. В).

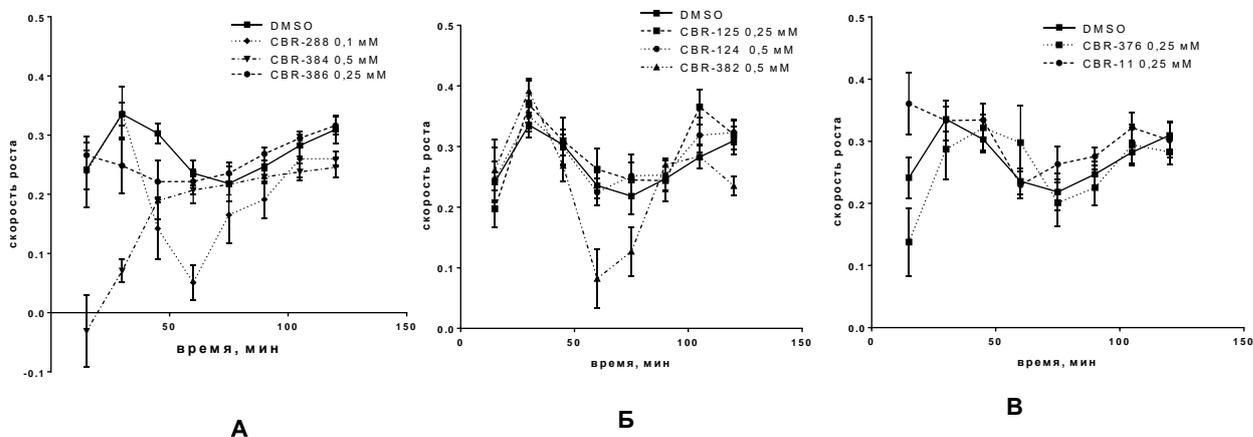


Рис. 1. Скорость роста бактерий *E. coli* в присутствии исследуемых ОАГС.

Таким образом, наблюдается влияние соединений, содержащих 1,4-оксазиновый фрагмент на скорость роста бактерий *E. coli* при переходе к микроаэробным условиям. Исследование влияния ОАГС на ростовые характеристики бактерий *E. coli* показало, что при разработке новых лекарственных средств необходимо учитывать их возможное действие на бактерии. Установление корреляции между структурными фрагментами молекул и их действием на бактерии *E. coli* может направить модификацию биологически активных молекул для получения лекарственных средств, безопасных для микробиома.

Исследованные вещества были синтезированы в НОЦ прикладных химических и биологических исследований ПНИПУ. Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/174.2.

Библиографический список

1. Gholizadeh P., Mahallei M., Pormohammad A., Varshochi M., Ganbarov K., Zeinalzadeh E., Yousefi B., Bastami M., Tanomand A., d Mahmood S. S., Yousefi M., Asgharzadeh M., Kafi H. S. Microbial balance in the intestinal microbiota and its association with diabetes, obesity and allergic disease // *Microb. Pathog.* 2019. V. 127. P. 48–55.
2. Pflughoeft K. J., Versalovic J. Human Microbiome in Health and Disease // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2012. V. 7(1). P. 99–122.
3. Maier L., Pruteanu M., Kuhn M., Zeller G., Telzerow A., Anderson E. E., Brochado A. R., Fernandez K. C., Dose H., Mori H., Patil K. R., Bork P., Typas A. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria // *Nature.* 2018. V. 555. P. 623–628.
4. Koppel N., Rekdal V. M., Balskus E. P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota // *Science.* 2017. V. 356. P. 1246–1257.
5. Enright E. F., Gahan C. G. M., Joyce S. A., Griffin B. T. The impact of the gut microbiota on drug metabolism and clinical outcome // *Yale Journal of Biology and Medicine.* 2016. V. 89(3). P. 375–382.

6. Clarke G., Sandhu K. V., Griffin B. T., Dinan T. G., Cryan J. F., Hyland N. P. Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions // *Pharmacol. Rev.* 2019. V. 71(2). P. 198–224.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БЫСТРОГО ОТВЕТА *ESCHERICHIA COLI* НА ДЕЙСТВИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА

Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Музыка Н.Г., Октябрьский О.Н.
ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, ципрофлоксацин, электрохимические сенсоры, сульфид

Обычно слежение за состоянием растущих культур бактерий осуществляется путем изъятия проб и последующего анализа с применением микробиологических и физико-химических методов. В процессе подготовки проб для анализа они подвергаются различным воздействиям (центрифугирование, концентрирование, разрушение и т.д.), которые являются стрессовыми для бактериальных клеток. Как следствие, полученные значения соответствующих параметров могут не соответствовать тем, которые наблюдаются *in vivo*. Это особенно касается параметров, связанных с дыхательной активностью и трансмембранными потоками ионов, которые отличаются быстрой реакцией на изменение условий окружающей среды. Одним из путей преодоления этой проблемы является использование электрохимических сенсоров, позволяющих измерять важные параметры без отбора проб, прямо в растущей бактериальной культуре. В этой работе мы исследовали ответ растущих бактерий *Escherichia coli* с дефектами в наружной мембране на действие антибиотика ципрофлоксацина с помощью электрохимических сенсоров.

В работе использовались штаммы *E. coli* MG1655 (wt) и мутант *ΔlpcA*, полученные от проф. Миронова А.С. Штамм *E. coli* NM7951 (*ΔompF*) был сконструирован путем трансдукции фага P1, используя штамм JW0912 из Keio коллекции. Мутант *ΔlpcA* имеет дефект в липополисахаридном (LPS) компоненте наружной мембраны и вследствие этого более проницаем для гидрофобных соединений, чем родительский штамм. Мутант *ΔompF* обладает нарушением в синтезе порина OmpF, белковой структуры наружной мембраны, образующей канал, проницаемый для небольших гидрофильных молекул [1]. Ципрофлоксацин относится к гидрофильным фторхинолонам, обладающим способностью проникать в клетки, как через порины, так и через LPS структуры [2].

Ночные культуры выращивались с перемешиванием (150 об/мин) на среде M9 с глюкозой (0.15%) [3]. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 100 мл свежей среды ($OD_{600} = 0.1$) и выращивали в аэробных условиях при 37°C в термостатируемом орбитальном шейкере до $OD_{600} = 0.4$. Способность к образованию колоний (CFU) и удельную скорость роста определяли общепринятым способом.

Измерения с применением электрохимических ион-селективных сенсоров проводили непосредственно в колбах (инвазивно) с аэробно растущими культурами. Все параметры непрерывно и синхронно обрабатывались в режиме реального времени с помощью единого аппаратно-программного комплекса, включающего несколько блоков регистрации. Парциальное давление кислорода (pO_2) измеряли полярографическим методом с помощью электрода Кларка InPro 6800 (Mettler Toledo) на модифицированном контроллере BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., USA). Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона

определяли с помощью сульфид-специфичного ионоселективного электрода XC-S²⁻-001 (Sensor Systems Company, РФ), изменение уровней экстраклеточных ионов калия (K⁺) регистрировали K⁺-селективным электродом ELIS-121K («Измерительные Технологии», РФ). Потенциометрические данные с этих электродов обрабатывались цифровыми рХ-метрами срХ-2 (ИБП, Пущино, РФ). Синхронизация первичных данных, получаемых с указанных сенсоров осуществлялась по протоколу RS-232 и Modbus. Более подробно используемые методы описаны в нашей предыдущей работе [4].

В наших условиях, несмотря на интенсивное перемешивание, дыхательная активность растущих клеток приводила к постепенному снижению парциального давления кислорода в среде (pO₂) вплоть до полного исчерпания по мере накопления биомассы. В отсутствие антибиотика не отмечено различий в скорости потребления кислорода между тремя испытанными штаммами.

В соответствии с нашими более ранними данными [5] ципрофлоксацин (ЦФ) вызывал фазовые изменения дыхания бактерий *E. coli* BW25113 (wt), которые строго зависели от концентрации антибиотика. После добавления 0.3 мкг/мл ЦФ мутанты продолжали потреблять кислород до конца наблюдения (Рис. 1А) со скоростью, несколько меньшей, чем в необработанных культурах. Изменения pO₂ в родительском штамме носили двухфазный характер. На первой фазе, длящейся примерно 30 мин после добавления антибиотика, эти бактерии сохраняли высокую скорость потребления кислорода, после чего начиналась вторая фаза, в которой наблюдалось повышение pO₂ как следствие ингибирования дыхания. Этот эффект мы наблюдали ранее в культурах *E. coli* BW25113 [5]. Длительность фазы снижения pO₂ совпадала со временем, в течение которого родительские клетки, обработанные 0.3 мкг/мл ЦФ, сохраняли высокую скорость роста. Примечательно, что через 30 мин после добавления ЦФ родитель еще сохранял высокую дыхательную активность, когда значительная часть популяции теряла способность к образованию колоний. Мутанты сохраняли эту способность до конца наблюдения. Наблюдалось соответствие между более высокой устойчивостью дыхательной активности мутантов по сравнению с родителем и их большей способностью к образованию колоний при данной дозе антибиотика.

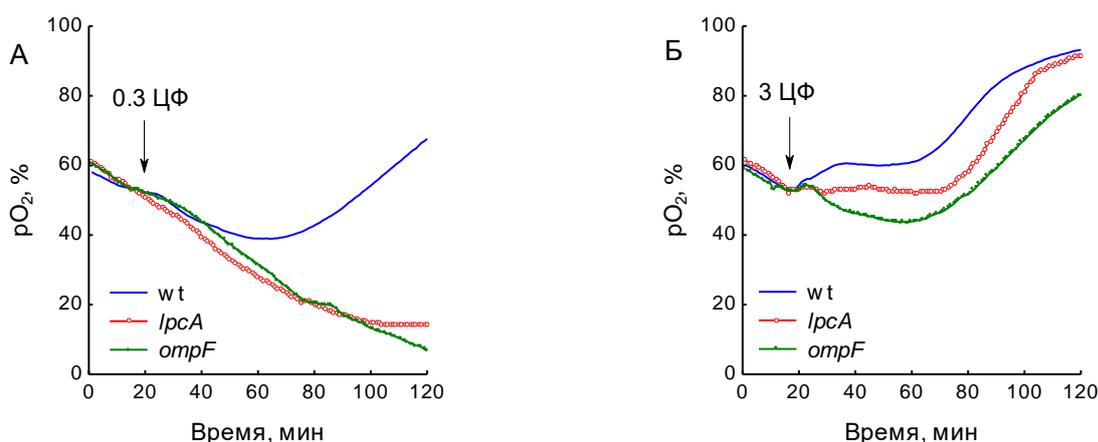


Рис. 1. Изменения парциального давления кислорода (pO₂) при действии 0.3 (А) и 3.0 (Б) мкг/мл ципрофлоксацина на растущие клетки *E. coli*.

При дозе 3 мкг/мл ЦФ ингибирование дыхания у всех трех штаммов наступало сразу после добавления ЦФ и включало фазы умеренного и быстрого ингибирования (Рис. 1Б). В наибольшей степени ингибирование дыхания было выражено у родительского штамма, в

наименьшей - у мутанта $\Delta ompF$. По времени фаза умеренного ингибирования дыхания соответствовала фазе быстрого падения скорости роста, а фаза быстрого ингибирования дыхания соответствовала фазе падения скорости роста и началу лизиса. В целом, в фазе быстрого ответа у трех штаммов наблюдалась тесная связь между степенью ингибирования дыхания и изменениями скорости роста и обратная связь между степенью ингибирования дыхания и выживаемостью. При действии 10 мкг/мл ЦФ сохранялся двухфазный характер изменения pO_2 и его соответствие фазам изменения скорости роста, но различия между всеми штаммами отсутствовали.

В отсутствие антибиотика рост культуры *E. coli* сопровождался поглощением из среды калия, в количестве, пропорциональном числу клеток, без существенных различий в скорости поглощения между штаммами, что соответствует незначительным различиям в скорости роста в этих условиях. После добавления 0.3 мкг/мл ЦФ клетки родительского штамма продолжали поглощать калий со скоростью, близкой к той, которая наблюдалась в отсутствие ЦФ. Через 45 мин после добавления антибиотика наблюдалось прекращение поглощения калия (Рис. 2А), что по времени соответствовало окончанию фазы быстрого ингибирования роста и началу фазы ингибирования дыхания (Рис. 1А). Мутант $\Delta ompF$ в этих условиях продолжал потреблять калий с той же скоростью, как в культурах, необработанных антибиотиком. Мутант $\Delta lpcA$ также продолжал потребление калия, хотя и со значительно меньшей скоростью, чем $\Delta ompF$ (Рис.2А). Обнаружена хорошая корреляция между изменениями экстраклеточного калия с одной стороны и CFU и изменениями мембранного потенциала у штаммов с другой стороны. Так же обнаруживается похожая кинетика изменений экстраклеточного калия и потребления кислорода (Рис. 1А).

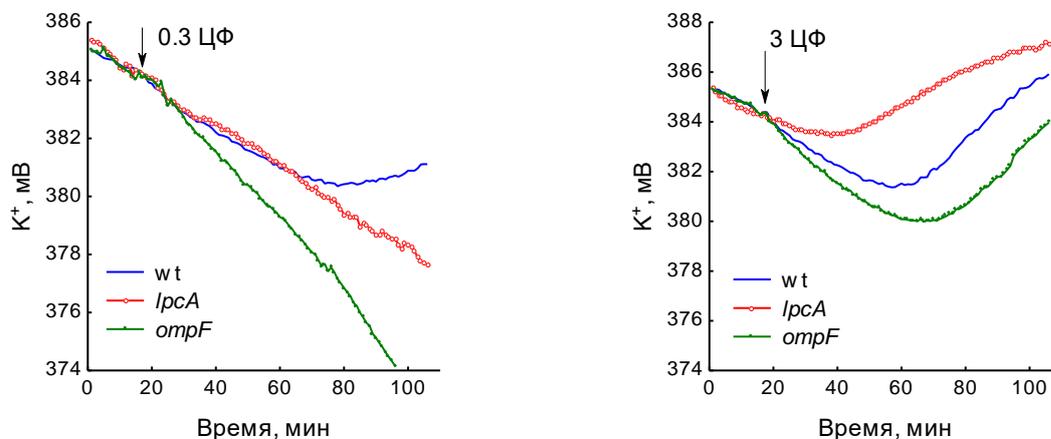


Рис. 2. Изменения уровня экстраклеточного калия при действии 0.3 (А) и 3.0 (Б) мкг/мл ципрофлоксацина на растущие клетки *E. coli*.

При действии 3.0 мкг/мл ЦФ у всех штаммов наблюдался двухфазный характер изменений концентрации внеклеточного калия. На первой фазе клетки продолжали потребление калия, хотя и с более низкой скоростью, чем необработанные клетки (Рис. 2Б). Эта фаза соответствовала периоду времени после воздействия антибиотика, когда все штаммы еще продолжали расти и сохраняли дыхательную активность. Через определенное время, характерное для каждого штамма, концентрация калия в среде начинала повышаться. Переход во вторую фазу примерно соответствовал времени резкого падения скорости роста и дыхательной активности. Увеличение уровня экстраклеточного калия может быть следствием лизиса клеток. Однако следует учесть, что такой наблюдаемый эффект у родительского штамма, мутантов $\Delta lpcA$ и $\Delta ompF$ начинался через 40, 20 и 70 мин

после добавления антибиотика, а начало лизиса через 60, 70 и 100 мин, соответственно. Это указывает на то, что увеличение экстраклеточного калия, связанное с лизисом клеток, может происходить на более поздних стадиях действия 3.0 мкг/мл ЦФ. На более ранних стадиях выход калия может быть связан с падением мембранного потенциала, обусловленного, в свою очередь, снижением дыхательной активности клеток (Рис. 1Б). В пользу этого свидетельствует высокая корреляция между изменениями концентрации экстраклеточного калия и мембранного потенциала через 60 мин после добавления антибиотика. Двухфазная мода изменений экстраклеточного калия сохранялась при действии 10 мкг/мл ЦФ. Оба мутанта при действии 0.3 и 10 мкг/мл ЦФ обладали большей способностью к удержанию калия, чем родительский штамм, тогда как мутант $\Delta ompF$ сохранял эту способность при всех испытанных дозах антибиотика.

Ранее было обнаружено, что при различных стрессах ингибирование роста бактерий *E. coli*, растущих аэробно на минеральных средах, сопровождается скачком редокс-потенциала (Eh) в область отрицательных значений. Показано, что этот скачок связан с обратимым увеличением уровня сульфида в среде. Список стрессов, индуцирующих сульфидный скачок, включает действие ряда антибиотиков, в том числе, обработку высокими концентрациями цiproфлоксацина [4]. Представляло интерес проверить, как влияют мутации $\Delta ompF$ и $\Delta lpcA$ на выброс сульфида при действии ЦФ.

В этом эксперименте растущие *E. coli* обрабатывали ЦФ в концентрации 0.3, 3, 10 и 20 мкг/мл. Клетки родительского штамма (MG1655) продуцировали сульфидный скачок при обработке 3 мкг/мл ЦФ и выше (Рис. 3А). Это соответствует ранее доложенным данным для *E. coli* BW25113 [4]. В мутанте $\Delta ompF$ индуцируемый антибиотиком выброс сульфида наблюдался только при 20 мкг/мл ЦФ (Рис. 3Б). Мутант $\Delta lpcA$ не обладал этой способностью при всех испытываемых дозах антибиотика.

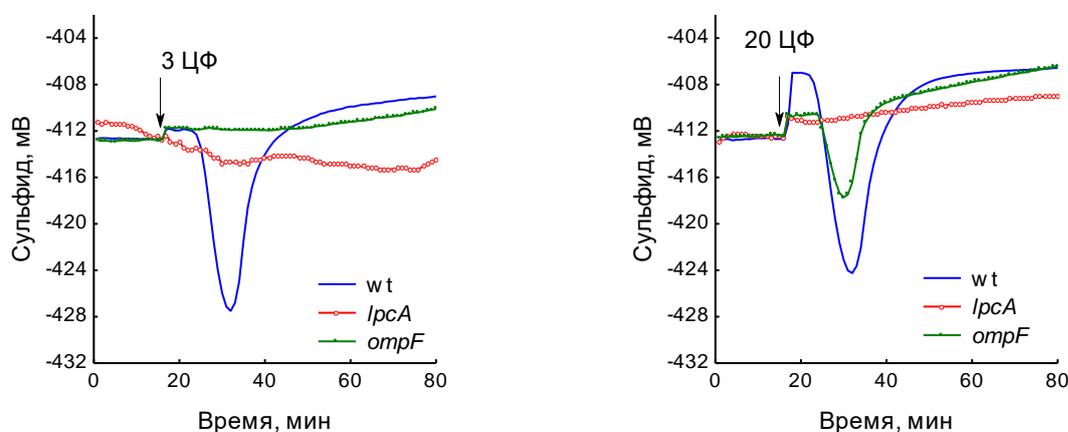


Рис. 3. Изменения уровня экстраклеточного сульфида при действии 3.0 (А) и 20.0 (Б) мкг/мл цiproфлоксацина на растущие клетки *E. coli*.

Применение электрохимических сенсоров в сочетании с непрерывной синхронной регистрацией параметров *real time* позволило выявить неизвестные ранее свойства мутантов *E. coli* по компонентам наружной мембраны. Полученные результаты показывают, что эти мутанты значительно различаются как от родительского штамма, так и между собой по таким важным параметрам как дыхательная активность, накопление внутриклеточного калия и выброс сульфида при быстром ответе на действие цiproфлоксацина. Требуются дальнейшие исследования, направленные на более глубокое изучение молекулярных механизмов, ответственных за наблюдаемые в этой работе феномены.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием АААА-А19-119112290009-1 и поддержана грантами РФФИ 19-04-00888, Президента РФ МК-420.2020.4 и фондом *Norpexal Foundation*.

Библиографический список

1. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // *Microbiol. Mol. Rev.* – 2003. – V. 67. – P. 593-656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>.
2. Hirai K., Aoyama H., Irikura T., Iyobe S., Mitsuhashi S. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1986. – V. 29. – P. 535-538.
3. Miller J.H. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York. 1972.
4. 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>.
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 redox status of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* – 2017. – V. 168. – P. 64-73. DOI – 10.1016/j.resmic.2016.07.008.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ РЕДОКС-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ГОЛОДАНИИ ПО ФОСФАТУ У *ESCHERICHIA COLI*

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

¹ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия.

²ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, фосфатное голодание, сульфид водорода, глутатион.

Все больший интерес ученых привлекает изучение низкомолекулярных серосодержащих редокс-активных соединений и их роль в метаболических путях и механизмах адаптации к неблагоприятным факторам в процессе жизнедеятельности микроорганизмов. Наибольшее значение среди низкомолекулярных тиолов (НМТ) этих соединений имеют сероводород (H₂S), глутатион (GSH) и цистеин. Несмотря на большое число работ в этом направлении (часто противоречивых), остается много нерешенных проблем, в особенности, касающихся роли НМТ при ответе бактерий на стрессы.

В последние годы выявлены новые пути участия НМТ в механизмах клеточного гомеостаза и адаптации к стрессам. Показано, что сульфид водорода, эндогенно продуцируемый клетками, способен повышать устойчивость к окислительному стрессу и различным классам антибиотиков у некоторых видов бактерий [1]. Поддержание низкого уровня внутриклеточного цистеина может играть важную роль при переходных процессах, поскольку этот тиол способствует генерации гидроксильных радикалов в реакции Фентона. Избыток цистеина, образующийся при резком ингибировании синтеза белка, может включаться в глутатион, экспортироваться из клеток или подвергаться деструкции с образованием H₂S [2]. Известно также, что в аэробно-растущих культурах бактерий *Escherichia coli* глутатион перманентно циркулирует между цитоплазмой клеток, периплазматическим пространством и средой культивирования. Циркуляция GSH тесно

связана с трансмембранными ионными потоками и нарушается при стрессовых воздействиях [3]. Настоящая работа посвящена изучению одной из мало изученных проблем, касающихся роли НМТ в ответе бактерий *E. coli* на голодание по фосфату.

В работе использовали штаммы *E. coli* BW25113 (родительский штамм) и мутанты JW2661 ($\Delta gshA$), дефектный по синтезу глутатиона, и штамм *E. coli* NM3351 ($\Delta ggt\Delta gsiA$) – сконструированный путем трансдукции фага P1, используя штаммы JW3412 (Δggt) JW5870 ($\Delta gsiA$) из коллекции Keio. Гаммаглутамилтранспептидаза (GGT) и кассетный АТФ-зависимый транспортер GsiA считаются основными известными импортерами глутатиона. В штамме NM3351, лишенном обеих транспортных систем, значительно затруднен вход глутатиона обратно в клетку.

Ночные культуры выращивались с перемешиванием (150 об/мин) при 37°C на среде MOPS с глюкозой (0.15%) с 2 мМ дигидрофосфата калия. После центрифугирования клетки ресуспендировали в 100 мл свежей среды ($OD_{600} = 0.2$) не содержащей неорганический фосфат и культивировали в аэробных условиях при 37°C в термостатируемом орбитальном шейкере. Определение общего глутатиона осуществляли с помощью высокоспецифичного метода Титца. Метод основан на взаимодействии GSH с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (DTNB) с образованием окрашенного продукта. Окисляющийся в ходе реакции дисульфид GSSG восстанавливается до GSH глутатионредуктазой в присутствии НАДФН. [4]. Парциальное давление кислорода измеряли непосредственно в культуральной среде электродом Кларка (Mettler Toledo). Концентрацию сульфид-ионов определяли потенциометрическим методом с применением сульфид-специфичного ионоселективного ХС-S²⁻-001 (Sensor Systems Company, РФ) и вспомогательного электродов с помощью цифрового рХ-метра срХ-2 (ИБП, Пушкино, РФ) [5]. Детекцию газообразной формы сульфида водорода проводили полуколичественным методом, измеряя его концентрацию в воздушной среде над бактериальной культурой бумажными полосками, пропитанными ацетатом свинца. Количественно изменение окраски определяли по гистограмме цвета в программе ImageJ, интенсивность выражали в процентах.

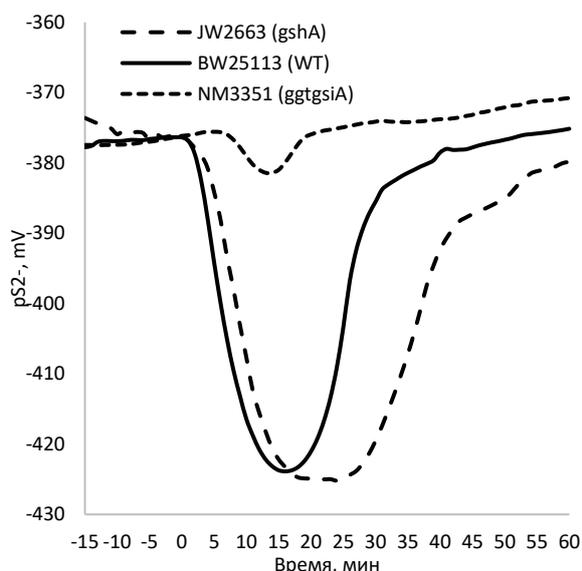


Рис. 1. Изменение потенциала сульфид-специфичного электрода в среде культивирования штаммов *E. Coli* при переходе к голоданию по фосфату.

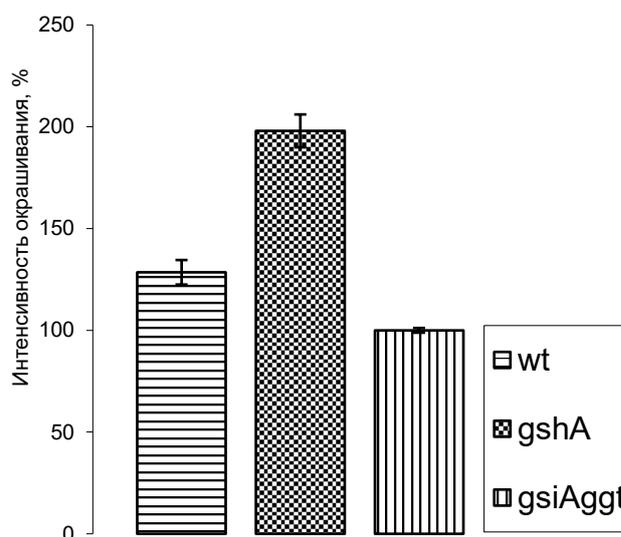


Рис. 2. Интенсивность окраски полосок, пропитанных ацетатом свинца, находящихся в воздушной среде над бактериальной культурой при голодании по фосфату. 100% - контрольная полоска.

У всех изучаемых штаммов при истощении источника неорганического фосфора в среде отмечалось постепенное снижение удельной скорости роста с 0.65 ± 0.03 до 0.17 ± 0.01 час⁻¹ со стабилизацией на этом уровне в течение длительного времени. Парциальное давление кислорода в культуральной среде сохранялось на уровне 85% от базового значения в течение всего эксперимента, что указывает на низкую дыхательную активность клеток при голодании по фосфату.

Через 18-20 мин после внесения инокулята в свежую среду, не содержащую фосфор, у родительского штамма BW25113 и мутантов по синтезу глутатиона ($\Delta gshA$), отмечалось резкое обратимое усиление продукции сульфида водорода, регистрируемое сульфид-специфическим электродом (рис. 1) в жидкой среде и потемнением индикаторных полосок с ацетатом свинца над бактериальной культурой (рис. 2). Мутанты $\Delta gshA$ интенсивно продуцировали сульфид в течение 27 мин, что в два раза дольше, чем клетки родителя (16 мин) (рис. 1). Амплитуда скачка потенциала сульфидного электрода у обоих штаммов BW25113 и JW2663 была близка и составляла 47 и 46 mV соответственно. Наблюдаемые различия в продукции H₂S подтверждаются большей (в 1.54 раза) интенсивностью окрашивания индикаторных полосок у GSH-мутантов в сравнении с родительским штаммом (рис. 2). Напротив, у клеток с нарушенным транспортом GSH ($\Delta ggt\Delta gsiA$), где сильно затруднен его импорт, отмечалось незначительное изменение продукции H₂S как в жидкой (скачок потенциала 8 мВ), так и в газовой среде, где интенсивность окраски не отличалась от контрольной полоски.

Полученные в этой работе данные дополняют список стрессовых воздействий, при которых в культурах *E. coli* наблюдается скачкообразный выброс сульфида в среду [5].

При переходе к голоданию по источнику фосфора у бактерий родительского штамма BW25113 уровень внеклеточного GSH постепенно снижался в 1.42 раза (1.46 ± 0.03 мкМ/OD₆₀₀) относительно растущей культуры (2.08 ± 0.24 мкМ/OD₆₀₀) и в дальнейшем сохранялся на этом уровне до конца эксперимента. Этот эффект может быть связан со значительным замедлением экспорта глутатиона в среду в данных условиях. У двойного мутанта $\Delta ggt\Delta gsiA$, напротив, отмечалось постоянное увеличение уровня внеклеточного глутатиона (с 1.75 ± 0.05 мкМ/OD₆₀₀ до 3.76 ± 0.09 мкМ/OD₆₀₀).

Ранее было показано, что глутатион может участвовать в регуляции пула цистеина, большие концентрации которого накапливаются в цитоплазме при стресс-индуцируемом ингибировании синтеза белка. В аэробных условиях цистеин может участвовать в реакции Фентона, ведущей к образованию гидроксильных радикалов, способных повреждать все биологически важные молекулы (ДНК, белки и липиды). Вследствие высокой токсичности цистеина, бактерии в процессе эволюции развили сложный механизм гомеостаза, позволяющий поддерживать внутриклеточное содержание этой аминокислоты на очень низком уровне. Регуляция пула внутриклеточного цистеина может осуществляться путем его включения в биосинтез GSH, деструкции с образованием H₂S или экспорта в периплазму и далее в окружающую среду. Образующийся в цитоплазме H₂S выходит свободно в среду культивирования путем простой диффузии [2].

Наблюдаемые в этой работе изменения НМТ при голодании по фосфату имеют общие черты, выявленные нами при других стрессовых ситуациях, сопровождающихся ингибированием роста и, соответственно, с ингибированием синтеза белка. В первую очередь это выброс H₂S в среду и связь этого процесса с глутатионом. У штамма JW2663 полностью лишённого GSH, отмечалась более продолжительная фаза усиленной генерации H₂S, в сравнении с родителем, у которого при наступлении голода продолжал поддерживаться экспорт глутатиона, хоть и на более низком уровне. У *E. coli* NM3351 с затрудненным импортом глутатиона ($\Delta ggt\Delta gsiA$) наблюдалась обратная картина –

постоянное накопление GSH в среде культивирования и сильно сниженная продукция сероводорода при переходе к голоданию по фосфору.

Следует отметить, что эти результаты получены благодаря применению генно-инженерных штаммов бактерий в сочетании с электрохимическими сенсорами.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием АААА-А19-119112290009-1 и поддержана грантами РФФИ 19-04-00888, Президента РФ МК-420.2020.4 и фондом *Norpexal Foundation*.

Библиографический список

1. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria // *Science*. – 2011. – V. 334. – P. 986-990. <https://doi.org/10.1126/science.1209855>.

2. 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. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02795-2>.

3. Smirnova, G.V. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells // *Microbiol. Res.* – 2012. – V. 167. – P. 166-172.

4. Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues // *Anal. Biochem.* – 1969. – V. 27. – P. 502-522.

5. 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>.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ ГЛИНИСТЫХ ОТЛОЖЕНИЙ РУДНИКА ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ

Усанина Д.И.¹, Пьянкова А.А.², Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь, Россия

Ключевые слова: Верхнекамское месторождение солей, галофильные и галотолерантные бактерии, гены 16S рРНК, секвенирование

В Пермском крае уже более 80-ти лет ведётся разработка Верхнекамского месторождения калийно-магниевых и натриевых солей (ВКМС). Наиболее распространенными породами соляной толщи ВКМС являются каменная соль, сильвиниты и карналлитовые породы, происхождение которых приурочено к Пермскому периоду Палеозойской эры [1]. На территории месторождения формируются уникальные сообщества микроорганизмов, выдерживающих высокие концентрации солей в среде. Ранее из наземных экотопов района солеразработок ВКМС были выделены галофильные и галотолерантные микроорганизмы различных таксонов [2, 3, 4], в том числе бактерии семейств *Halomonadaceae* и *Bacillaceae* [5, 6]. Разнообразие микроорганизмов глубоководных соляных разработок (рудников) ранее не исследовалось. Цель настоящей работы – изучение бактерий, выделенных из глинистых отложений рудника Верхнекамского месторождения солей.

Для исследования были использованы высокоминерализованные образцы глины из рудника ВКМС (Пермский край). Накопительные культуры (НК) с исследуемыми образцами были получены на богатой среде Раймонда (БСР) [7] с добавлением 150 г/л NaCl. Из НК осуществляли высеив на агаризованную БСР (150 г/л NaCl). Отбор чистых культур микроорганизмов основывался на различиях в морфологии колоний, выросших на агаризованной среде. В результате, из исследуемых образцов было отобрано для дальнейшего изучения 19 штаммов бактерий.

Методом ВОХ-ПЦР [8] было проведено ДНК-типирование полученных бактериальных штаммов, в результате чего выделенные бактерии были объединены в 14 геномогрупп (рис. 1). Определение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК у представителей каждой геномогруппы было осуществлено с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystem», США) в Пермском государственном национальном исследовательском университете (кафедра ботаники и генетики растений). В результате сравнения последовательностей гена 16S рРНК с типовыми видами из базы данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>) было установлено, что 12 выделенных культур относятся к классу *Gamma*proteobacteria (семейство *Halomonadaceae*), 2 штамма – к классу *Bacilli* (семейство *Bacillaceae*). Уровень сходства исследуемых изолятов с типовыми штаммами узаконенных видов находится в пределах 98.96-100% (табл. 1). Однако штамм D12 имеет низкий уровень сходства (98.96%) с тремя типовыми штаммами рода *Halomonas*, и может представлять новую таксономическую единицу.

Стоит отметить, что большинство изолятов, сходных с *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T, идентичны по нуклеотидному составу гена 16S рРНК, однако сравнительный анализ ВОХ-профилей данных изолятов показал их принадлежность к разным геномогруппам (рис. 1).

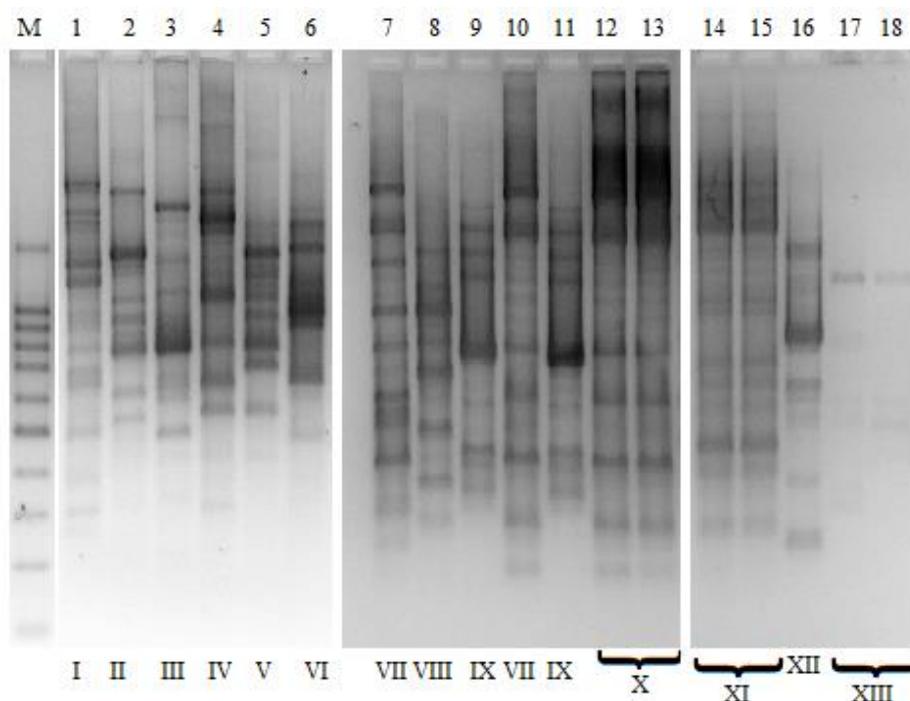


Рис. 1. Агарозный гель-электрофорез продуктов амплификации ВОХ-ПЦР штаммов бактерий, изолированных из образцов глинистых отложений. М - Маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия), 1 – DG3G; 2 – DG2M; 3 – DG2K; 4 – DK1K; 5 – DK1M; 6 – DR1; 7 – D1; 8 – D2; 9 – D3A; 10 – D3B; 11 – D4; 12 – D5; 13 – D5A; 14 – D10; 15 – D11; 16 – D12; 17 – D13A; 18 – D13B. I - XIII – геномогруппы.

Также штаммы *Halomonas* sp. DR1 и D2 с идентичными нуклеотидными последовательностями гена 16S рНК имеют разные ВОХ-профили. Таким образом, среди исследуемых изолятов выявлена генетическая гетерогенность.

Изучены физиологические свойства выделенных бактерий. В результате высева изолятов на агаризованную БСР с различными концентрациями хлорида натрия было установлено, что среди полученных штаммов присутствуют галотолерантные и галофильные организмы (табл. 2). Так, изоляты, близкородственные штамму *Chromohalobacter canadensis* ATCC 43984^T, являются строго галофильными и способны к росту в среде с содержанием хлорида натрия в концентрациях от 30 до 300 г/л. Также галофильным является штамм *Halomonas* sp. DR1, у которого наблюдается рост при концентрации 10-250 г/л хлорида натрия в среде. Все остальные культуры являются галотолерантными и способны к эффективному росту при содержании NaCl в среде культивирования до 250 г/л.

Путём высева на агаризованную БСР (70 г/л NaCl) был исследован диапазон роста бактерий при различных значениях pH среды (табл. 3). Установлено, что все изоляты способны к росту при значении водородного показателя 7.0-8.0. Кроме того, некоторые штаммы способны расти при более высоких значениях pH среды – до 10.0, т.е. являются алкалофилами.

Таблица 1

Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рНК

Штамм	Типовой штамм	Номер GenBank	Сходство, %
Семейство Halomonadaceae (класс Gammaproteobacteria, порядок Oceanospirillales)			
DK1K	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T	AJ295143	99.56
DG3G	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T	AJ295143	99.89
D1	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T	AJ295143	99.89
D5	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T	AJ295143	99.89
D10	<i>Chromohalobacter canadensis</i> ATCC 43984 ^T	AJ295143	99.89
DK1M	<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS ^T	AJ564880	100.00
DR1	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T	AY671975	99.45
DG2K	<i>Halomonas utahensis</i> DSM 3051 ^T	AJ306893	99.02
DG2M	<i>Halomonas titanicae</i> BH1 ^T	AOPO01000038	100.00
D2	<i>Halomonas taeanensis</i> BH539 ^T	AY671975	99.43
D3A	<i>Halomonas alimentaria</i> YKJ-16 ^T	AF211860	100.00
D12	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	AJ306891	98.96
	<i>Halomonas piezotolerans</i> NBT06E8 ^T	MN435603	
	<i>Halomonas songnenensis</i> NEAU-ST10-39 ^T	JQ762289	
Семейство Bacillaceae (класс Bacilli, порядок Bacillales)			
DG3K	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i> DSM 10037 ^T	AY543169	100.00
D13A	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. <i>incaldanensis</i> 20AG ^T	AJ640134	100.00

Также была определена способность бактерий к росту при различных температурах. Для этого изоляты высевали на БСР (70 г/л NaCl) и инкубировали при различных температурах. У всех изучаемых штаммов была отмечена способность к росту в диапазоне температур от +4°C до 40°C, что характеризует их как термотолерантных микроорганизмов. Примечательно, что штамм *Virgibacillus* sp. DG3K не только является алкалофилом, но

также способен к эффективному росту при температурах до +45°C. В литературе имеются данные о способностях ряда галоалкалофильных штаммов семейства *Bacillaceae* к росту в условиях высоких значений рН и повышенной солёности [9, 10]. При температуре ниже +4°C рост культур не наблюдался.

Таблица 2

Рост изолятов в присутствии разных концентраций NaCl в среде культивирования

Штамм	Концентрация NaCl, г/л											
	0	10	30	50	70	100	150	200	250	270	300	
DK1K	–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DG3G	–	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DK1M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	–	–	–
DR1	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–	–	–
DG2K	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	–	–
DG2M	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	–	–	–
DG3K	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	–	–	–

Примечание: «+» – слабый рост, «++» – средний рост, «+++» – хороший рост, «–» – отсутствие роста.

Таблица 3

Рост бактерий при различных значениях рН в среде культивирования

Штамм	Значение рН					
	5.0	6.0	7.0	8.0.	9.0.	10.0
DK1K	–	++	+++	+	+	–
DG3G	–	++	+++	+	+	–
DK1M	–	+	+++	+++	++	+++
DR1	–	+	+++	+	–	–
DG2K	–	+++	+++	+++	++	+++
DG2M	–	+++	+++	+++	+++	+++
DG3K	–	–	+++	+++	+++	+

Примечание: «+» – слабый рост, «++» – средний рост, «+++» – хороший рост, «–» – отсутствие роста.

Способность бактерий разлагать ароматические углеводороды оценивали путём культивирования на минеральной среде Раймонда (MCP) (70 г/л NaCl) с добавлением бензойной (1 г/л) и салициловой кислот (0.5 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Изолят *Halomonas* sp. DK1M способен к эффективному росту на MCP с салициловой кислотой, а штамм *Halomonas* sp. DR1 проявляет способности к деструкции бензойной кислоты.

В результате исследования образцов глинистых отложений рудника Верхнекамского месторождения были получены новые данные о филогенетическом разнообразии культивируемых бактерий ВКМС. Выделено 19 штаммов, относящихся к классу *Gammaproteobacteria* (семейство *Halomonadaceae*) и классу *Bacilli* (семейство *Bacillaceae*). Штаммы являются галотолерантными и галофильными бактериями, некоторые из которых способны к росту при концентрации хлорида натрия в среде до 300 г/л. Все исследуемые изоляты относятся к термофильным микроорганизмам. Большинство штаммов также способны к росту в щелочной среде. Два штамма рода *Halomonas* проявляют способности к деструкции ароматических углеводородов, что делает перспективным дальнейшее их изучение.

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

Библиографический список

1. Кудряшов А.И. Верхнекамское месторождение солей. Пермь: ГИ УрО РАН, – 2001. – 429 с.
2. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov. – умеренно галофильная бактерия из ассоциации микроорганизмов, утилизирующей нафталин / Л.Н. Ананьина [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 3. – С. 369-376.
3. Разнообразие бактерий, выделенных из района разработок месторождения калийных солей Верхнекамья / О.В. Ястребова [и др.] // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2009. – Вып. 10. – № 36. – С. 124-129.
4. Реутских Е.М., Саралов А.И. *Exiguobacterium* sp. RS34 – галоалкалотолерантная факультативно анаэробная неспорообразующая бактерия порядка *Bacillales* из шламоохранилища калийного рудника // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2012. – № 3. – С. 49-53.
5. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей / Е.С. Корсакова [и др.] // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 2. – С. 247-250.
6. Ястребова О.В., Ананьина Л.Н., Плотникова Е.Г. Бактерии рода *Bacillus*, выделенные из почв района солеразработок // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2008. – Вып. 9. – № 25. – С. 58-62.
7. Raymond, R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop Ind Microbiol.* – 1961. – V. 2. – № 1. – P. 23-32.
8. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction / J. Versalovic [et al.] // *Meth Cell Mol Biol.* – 1994. – V. 5. – P. 25-40.
9. *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkalophilic, halotolerant bacterium isolated from Kenyan soda lake / A.V. Vargas [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2005. – V. 55. – P. 899-902.
10. Sorokin I.D., Kravchenko I.K., Doroshenko E.V. Haloalkaliphilic diazotrophs in soda solonchak soils // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2008. – V. 65. – P. 425-433.

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ НЕГАТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАСТИТЕЛЬНОСТЬ ОРБИТОЦЕНОЗОВ В ГОРОДЕ ИЖЕВСКЕ

Федоров А.М.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Россия.

Ключевые слова: Ижевск, орбитоценоз, зелёные насаждения, воздействие.

Урбанизированная среда – это сложная и динамичная система, особенностью которой является мощное комплексное воздействие различных негативных факторов на природные элементы среды и население. Для стабилизации экологической составляющей урбаносреды, а также для благотворного влияния на здоровье и психофизиологическое состояние населения используются зелёные насаждения. Стабилизирующая роль зелёных насаждений заключается в регулировании состояния и состава атмосферного воздуха, оказании фитонцидного воздействия, влиянии на тепловой режим городской среды, снижении шумового воздействия и выполнении декоративно-планировочной функции [1]. В данной работе рассматриваются насаждения улиц городской территории, а именно –

растительность орбитоценозов, т.е. зелёные насаждения в полосах отвода. Данная группа насаждений играет важную роль в сфере защиты урбанизированной среды от негативных антропогенных факторов [3]. Исходя из вышесказанного, изучение зелёных насаждений орбитоценозов – является актуальным направлением в современной урбаноэкологии.

Целью работы являлось выявление основных факторов негативного воздействия на растительность орбитоценозов в городе Ижевске и их последствия. Для достижения цели необходимо было выполнить следующие задачи: инвентаризировать видовой и возрастной составы насаждений орбитоценозов, оценить состояние зелёных насаждений, выявить основные фитопатологии и причины их возникновения, изучить литературные источники по данному вопросу, на основе полученных данных выявить основные негативные факторы и степень их воздействия на зелёные насаждения.

Исследования проводились в июле-сентябре 2016-2020 гг. Определение видового состава зелёных насаждений орбитоценозов происходило маршрутно-детальным методом с помощью определителей А.И. Ванина и П.Ф. Маевского [2,4]. Древесные породы оценивались визуально по шкале категорий из санитарных правил РФ [7]. Определение фитопатологий и причин их возникновения производилось при помощи учебного пособия Ю.А. Чикина [8]. Для исследования были выбраны 20 участков с различной степенью антропогенной нагрузки общей протяженностью около 12,3 км.

В результате исследования выбранных участков было выявлено 12 древесных пород: берёза повислая (*Betula pendula* Roth), клён ясенелистный (*Acer negundo* L.), ясень пенсильванский (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.), тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.), рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.), липа мелколистная (*Tilia cordata* Mill.), вяз гладкий (*Ulmus laevis* Pall.), яблоня сливолистная (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.), клён остролистный (*Acer platanoides* L.), клён татарский (*Acer tataricum* L.), лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.), дуб черешчатый (*Quercus robur* L.). Доминирующими породами на участках оказались: берёза повислая, клён ясенелистный, липа мелколистная. По возрастному составу самой многочисленной группой оказались средневозрастные деревья. Посадки старых и молодых деревьев малочисленны, а на некоторых участках отсутствуют вовсе. В травянистом ярусе орбитоценозов доминировали следующие виды: мать-и-мачеха обыкновенная (*Tussilago farfara* L.), подорожник большой (*Plantago major* L.), клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* L.), мятлик луговой (*Poa pratensis* L.).

Оценка состояния древесных насаждений орбитоценозов выявила самые резистентные к урбаносреде породы: ясень пенсильванский, яблоня сливолистная. Самыми уязвимыми породами оказались: лиственница сибирская, вяз гладкий, берёза повислая, липа мелколистная. Средний балл состояния древесных насаждений по всем участкам в 2016-2019 гг. колебался от 2,56 до 2,84, что характеризуется как переходное состояние от ослабленной фазы к сильно ослабленной. Этот факт свидетельствует о том, что древесные породы орбитоценозов города Ижевска сильно подвержены воздействию негативных факторов урбаносреды. В 2020 году средний балл состояния древесных насаждений составил 1,86, что характеризуется как переходное состояние от абсолютно неослабленной фазы к ослабленной фазе. Так же отмечаются различия и в количестве наблюдаемых фитопатологий у древесной растительности орбитоценозов. В 2016-2019 гг. доля поражённой фитопатологиями кроны у некоторых видов древесных пород (берёза повислая, липа мелколистная, клён остролистный) в июле варьировалась от 10% до 25%. В сентябре данная доля увеличивалась до 45%. В 2020 году количество поражённых листовых пластинок в кроне снизилась. В июле доля поражённой фитопатологиями кроны варьировалась от 5% до 10%. В сентябре не превышала 25%. Доминирующими

фитопатологиями во все года мониторинга являлись: некрозы и хлорозы листовой пластинки, краевой ожог листовой пластинки. У берёзы повислой каждый год наблюдался ранний опад листьев. У лиственницы сибирской в 2016-2018 г. наблюдался самый низкий средний балл состояния, а также отмечался высокий уровень поражённости фитопатологиями (усыхание ветвей и верхушки, пожелтение и побурение хвои). В 2020 г. в посадках орбитоценозов с лиственницей сибирской наблюдалось улучшение общего состояния данной древесной породы, а также уменьшилось количество наблюдаемых фитопатологий. Оценка состояния травянистого покрова орбитоценозов выявила, что проективное покрытие на разных исследуемых участках варьируется от 20% до 95%. На некоторых участках отмечается практически полная деградация травянистого покрова или его полное отсутствие.

Основываясь на данных, полученных при полевых исследованиях и из литературных источников, было выделено три основных негативных фактора, влияющих на растительность орбитоценозов города Ижевска: противогололёдные реагенты, промышленные объекты, автотранспорт. Противогололёдные реагенты используются каждый год в холодный период для предотвращения оледенения дорог и тротуаров. В городе Ижевске до 2019 года повсеместно использовали обычную противогололёдную солевую смесь. Обильное применение данной смеси приводило к засолению почв в полосах отвода, что в свою очередь негативно влияло на слабосолевыносливые древесные породы, в первую очередь – хвойные [6]. С 2019 года начали применять реагенты нового поколения, использование которых снизило нагрузку на растительность орбитоценозов.

Загрязнение атмосферного воздуха – также оказывает негативное воздействие на растительность орбитоценозов. Это подтверждается наблюдаемыми фитопатологиями (некрозы, краевой ожог листовой пластинки). Предприятия города Ижевска вносят самый большой вклад в загрязнение атмосферного воздуха от стационарных источников: предприятия теплоэнергетики – 58,4%, чёрная металлургия – 10,7%, машиностроение – 13,7%, прочие – 17,2 %. Большую часть выбросов от данных стационарных источников составляют диоксид углерода, оксид азота, сернистый ангидрид, углеводороды, летучие органические соединения, пыль. Загрязнение атмосферного воздуха от данных источников носит в большинстве случаев локальный характер, но возможно распространение на большие расстояния по направлению преобладающего ветра. Но в последние годы в городе Ижевске количество выбросов от стационарных источников загрязнения значительно сократилось, что связано не только со спадом промышленного производства, но и с применением новых технологий и выполнением других природоохранных мероприятий [5]. Из этого следует, что доля негативного воздействия на растительность орбитоценозов промышленными предприятиями снижается.

Основной объем загрязняющих веществ в атмосферный воздух поступает от автотранспорта. В городе Ижевске в 2006-2010 гг. доля выбросов от передвижных источников загрязнения составляла от 78 до 85%. Рост автопарка города Ижевска в среднем в год составляет 1,5-2 тыс. единиц автотранспорта. В окружающую среду кроме загрязняющих веществ, которые образуются при сжигании топлива, поступают продукты износа дорожного полотна и резиновая крошка с частицами тяжёлых металлов [5]. Также негативное воздействие оказывает автотранспорт при парковке в полосах отвода. Это приводит к переуплотнению почвы и деградации растительного покрова.

Из всего вышесказанного можно сделать следующие выводы: основным фактором негативного воздействия на растительность орбитоценозов является автотранспорт, влияние промышленных предприятий и противогололёдных реагентов было снижено в последние годы благодаря введению новых технологий и материалов. Также при получении

подобных результатов было выдвинуто предположение о снижении уровня воздействия негативных антропогенных факторов на территории города Ижевска в 2020 году из-за введения ограничительных мер на фоне глобальной пандемии коронавирусной инфекции COVID-19.

Библиографический список

1. Бухарина И. Л., Журавлева А.Н., Большова О.Г. Городские насаждения: экологический аспект: монография / И.Л. Бухарина, А.Н. Журавлева, О.Г. Большова – Ижевск: Изд-во «Удмуртский университет», 2012. – 206с.
2. Ванин А.И. Определитель деревьев и кустарников. М.: Лесная промышленность, 1967. – 241 с.
3. Горышина Т. К. Растение в городе / Т. К. Горышина. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1991. – 152 с.
4. Маевский П. Ф. Флора средней полосы европейской части России. — 10-е исправленное и дополненное издание. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. — С. 2—12. — 600 с.
5. Малькова И.Л., Семакина А.В. Социально-гигиенический мониторинг состояния атмосферного воздуха г.Ижевска: монография. – Ижевск: Издательский центр «Удмуртский университет», 2018. – 122 с.
6. ОДМ 218.011-98. Методические рекомендации по озеленению автомобильных дорог. – М.,1998
7. Санитарные правила в лесах Российской Федерации – М.: Минюст РФ, 2006.
8. Чикин Ю.А. Общая фитопатология (часть 1): учебное пособие. – Томский госуниверситет – Томск, 2001 – 170 с.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ

Филатова В.Н., Моисеев Е.А., Моисеева К.В.

ФГБОУ ВО Государственный аграрный университет Северного Зауралья, г. Тюмень, Россия

Ключевые слова: многолетние растения, Береза повислая (*Betula pendula* Roth), площадь листьев, тканевая диагностика.

Тюмень – крупный промышленный город. На территории Тюменской области, около 95% отходов производства образуются от деятельности 50 крупнейших предприятий [2]. Ведущие отрасли промышленности: нефтеперерабатывающая, химическая, машиностроение, металлообработка, лесная и деревообрабатывающая, медицинская, предприятия по производству стройматериалов и др. Основной вклад в атмосферу города составляют выбросы от стационарных источников: предприятия нефтеперерабатывающей промышленности (77,2%) и электроэнергетики (4,3%). На долю автотранспорта приходится 36% от общего объема выбросов [3].

Основу управления продуктивностью культур составляет изучение процессов питания растений. Задачей обеспечения оптимального питания растений на протяжении всей вегетации служат методы оперативной почвенно-растительной диагностики, которая позволяет выяснить состояние обеспеченности растений питанием. Большой вклад в развитие диагностики питания растений внесли Д.Н. Сабинин, В.В. Церлинг, К.П. Магиницкий [8].

Научной основой растительной диагностики является теория минерального питания растений. Изменения в химическом составе тканей и органов вызывают изменения в интенсивности биохимических процессов и сопровождаются морфологическими изменениями листьев и других органов растений (окраска, форма, расположение, площадь, длина и др.).

Цель исследования: изучение биологических и эколого-физиологических особенностей древесных растений на примере Березы повислой (*Betula pendula* Roth).

Исследования проводились в 2019 году, с трехкратной повторностью, на временных пробных площадях. Объект исследования береза повислая (*Betula pendula* Roth) из семейства Betulaceae, в каждом из участков исследовалось по пять деревьев. Возраст растений, используемых для наблюдения, примерно одинаков. С каждого модельного дерева с южной стороны кроны, обращенной к дороге, с высоты 1,5-2 м от земли, срывали по 30 неповрежденных максимально развитых листьев. Листья с целью долговременного хранения гербаризированы и этикированы. Был обследован кордон шириной 150 метров, у автотрассы – Старый Тобольский тракт. Кордон делится на 3 зоны: зона I – ширина 40 м (примыкает к автотрассе Старый Тобольский тракт); зона II – ширина 50 м (зона умеренного антропогенного воздействия); зона III – ширина 60 м (зона относительно слабого антропогенного воздействия). Площадь листьев определяли методом высечек. Тканевую диагностику минерального питания определяли в учебной лаборатории «Физиологии растений» на приборе ОП-2. Определяли содержание минеральных форм питательных элементов в свежих пробах растений без озоления, используя срезы индикаторных органов, богатых сосудисто-проводящими тканями (стебли, черешки, главные жилки листьев).

Береза повислая (*Betula pendula* Roth) широко применяется в озеленении, переносит низкие температуры, весенние заморозки, мало требовательна к почвам. Светолюбива. Газоустойчива [10].

Погодные условия Тюменской области формируются исключительно из условий географического расположения. По природно-климатическим условиям территория под опытом находится в северной части Тюменской области. Климат Тюменской области характеризуется как резко континентальный [4].

В июле 2019 года средняя температура воздуха днем отмечена на уровне +24⁰С, ночью +15⁰С. Максимальная дневная температура +31⁰С продержалась с 13 по 15 июля. Минимальная отмечена 30 июля +16⁰С. Ночью температура в исследуемый период опускалась до +9⁰С 31 июля, а поднималась до +22⁰С – 16 июля. Осадков выпало ниже среднемноголетних данных.

Рост растений может происходить только при определенных благоприятных условиях температуры, света, влажности почвы и воздуха. Каждому виду необходимы для жизнедеятельности условия, действующие в тесном взаимодействии друг с другом [6]. Элементы минерального питания также участвуют в регуляции процессов фотосинтеза и продуктивности растений [5]. Недостаток некоторых элементов может снижает процесс фотосинтеза [7].

Высота Березы повислой (*Betula pendula* Roth) варьировала в исследовании от 25 до 32 м (увеличение отмечено в сторону отдаления от трассы). По степени развитости кроны отмечена изреженность в I и II зонах, более густая крона в III зоне. Такая же тенденция отмечена пораженностью энтомофагами и фитопатогенами. Площадь листьев увеличивалась от 16,2 до 22,3 см², в зависимости от снижения антропогенной нагрузки (Таблица 1).

Данные внешнего осмотра представителей древесно-кустарниковых пород (среднее значение)

Порода	Средняя высота, м	Степень развитости крон	Наличие сухих ветвей, кол-во	Площадь листьев, см ²
		I зона		
Береза повислая (<i>Betula pendula</i>)	25	сильно изреженная	18	16,2
		II зона		
Береза повислая (<i>Betula pendula</i>)	32	изреженная	28	20,5
		III зона		
Береза повислая (<i>Betula pendula</i>)	29	густая	10	22,3

Н.В. Турмухаметова отмечает, что по мере адаптации древесных растений к условиям техногенного загрязнения может происходить и удлинение параметров [9]. Эта закономерность так же прослеживается и в наших исследованиях.

В ходе работы нами было изучено состояние коры на стволах Березы повислой и пораженность энтомофагами, фитопатогенами, в I зоне на высоте 1 м ствол был покрыт лишайником, настоящим трутовиком диаметром 10 см, ствол имел черные извилистые линии возле поражения. Во II зоне отмечена небольшая пораженность березовым заболонником (*Scolytus (Eccoptogaster) ratzeburgi* Jans), имеются лучеобразные ходы в коре от деятельности березового заболонника (*Scolytus (Eccoptogaster) ratzeburgi* Jans). В III зоне нами не выявлено повреждений.

Для нормального роста и развития, кроме углерода, водорода и кислорода (который растения получают с воздухом и водой), растениям необходимо еще три основных элемента – азот (N), фосфор (P₂O₅), калий (K₂O) – макроэлементы [1]. По тканевой диагностике минерального питания древесных растений потребность в этих элементах у Березы повислой (*Betula pendula* Roth) – средняя (2 балла).

По изучаемым нами характеристикам можно сделать вывод об особенностях адаптации Березы повислой (*Betula pendula* Roth) к действию загрязняющих веществ и возможности использования ее для мониторинга окружающей среды и озеленения городских улиц.

Библиографический список

1. Акатьева Т.Г. Использование метода биоиндикации в оценке качества атмосферного воздуха // Современная наука-агропромышленному комплексу: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 135-летию первого среднего учебного заведения Зауралья – Александровского реального училища и 55-летию ГАУ Северного Зауралья, 2014. – С. 3-6.
2. Аминова К.З. Эколого-биологическая характеристика Дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в условиях техногенного загрязнения (на примере Уфимского промышленного центра): дисс. ... канд. биол. наук / Уфа, 2016. – 163 с.
3. Церлинг В.В. Диагностика питания сельскохозяйственных культур: справочник // М.: ВО Агропромиздат, 1990.
4. Шадрин В.А., Ефимова Т.П. Деревья и кустарники Удмуртии: Определитель // Ижевск: Изд-во Удм. ун-та, 1996. – С. 40.
5. Иваненко А.С., Кулясова О.А. Агроклиматические условия Тюменской области / Тюмень: Изд-во ТГСХА, 2008. – 206 с.

6. Колесникова С.А., Филимонова С.С., Моисеева К.В. Приспособленность дикорастущих и культурных растений в изменяющихся условиях среды // в сб.: Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам Материалы III международной молодежной научно-практической конференции. 2018. – С. 272-274.

7. Кефели В.И. Физиологические основы конструирования габитуса растений / М.: Наука, 1994. – 269 с.

8. Рахманкулова З.Ф., Федянов З.С., Подашевка О.А. Альтернативные пути дыхания и вторичный метаболизм у растений с разными типами адаптивных «стратегий» при дефиците элементов минерального питания // Физиология растений. – 2003. – Т. 50. – № 2. – С.231-237.

9. Турмухаметова Н.В. Особенности морфогенеза побегов и феноритмов *Betula pendula* Roth и *Tilia cordata* Mill. в условиях городской среды: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2005. – 19 с.

10. Авдонин Н.С. Агрехимия // М.: МГУ, 1981. – 343 с.

БРЮХОНОГИЕ МОЛЛЮСКИ ТРОИЦКОГО ЗАКАЗНИКА И ЕГО ОКРЕСТНОСТЕЙ

Филиппова А.С.

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Брюхоногие моллюски (Gastropoda) представляют собой таксономически разнообразную, экологически пластичную и весьма широко распространенную группу беспозвоночных животных. Без их изучения невозможно ни комплексное исследование наземных и водных экосистем, ни решение важнейших практических задач, как профилактика трематодозов, оценка рыбохозяйственного значения водоемов и биомониторинг. Малакологические данные используются также в целях стратиграфии [2, 5, 11].

В малакофаунистическом отношении территория нашей страны изучена крайне неравномерно, таким образом, проведение региональных фаунистических исследований, инвентаризация видового состава животных, выявление особенностей их распространения – остается актуальной задачей зоологии.

Основу оригинальных данных составляют результаты таксономической обработки брюхоногих моллюсков из фаунистических сборов и гидробиологических проб, выполненные автором в ходе экспедиционных и стационарных исследований в Троицком заказнике и его окрестностях в период с 30 мая по 19 июля 2019 г.

Сбор брюхоногих моллюсков осуществляли согласно общепринятым методикам [1, 3, 7]. Пробы водных гастропод были взяты из следующих водоемов: оз. Пастушье, водопой, водопой у гос. конюшни, оз. Шамрат, оз. Кукай, р. Уй и оз. Моховое. Наземных моллюсков отбирали в трех биотопах: березовые колки, вишарник и побережье озера Кукай. Коллекция (сухой материал, 70%-ный спирт) хранится на кафедре зоологии беспозвоночных и водной экологии Пермского государственного национального исследовательского университета.

Определение видовой принадлежности моллюсков проводилось по признакам раковины и особенностям строения мягкого тела с использованием определителей и отдельных статей [4, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18].

На основании изучения авторской коллекции моллюсков и критического анализа литературных данных для Троицкого заказника и его окрестностей выявлено 35 видов из 26 родов и 16 семейств наземных и пресноводных Gastropoda.

По оригинальным данным фауна наземных моллюсков Троицкого заказника включает 14 видов, принадлежащих к 11 семействам и 12 родам.

Наиболее разнообразно представлены моллюски семейств Succineidae, Vallonidae и Vertiginidae (по 2 вида). В остальных семействах отмечено только по одному виду.

Фауна пресноводных брюхоногих моллюсков насчитывает 21 вид, принадлежащий к 5 семействам и 14 родам. Наиболее разнообразно представлены моллюски семейства Planorbidae (9 видов). Среди Lymnaeidae выявлено 6 таксонов. Семейства Bithyniidae, Physidae и Valvatidae насчитывают по 2 вида каждое.

Наибольшее видовое разнообразие пресноводных гастропод отмечено в водоемах с относительно благоприятными условиями (оз. Шамрат – 12 видов, оз. Пастушье – 9 видов). Во временных водоемах видовой состав моллюсков снижается в 2-3 раза, что, вероятно, связано с непостоянством условий обитания. Наибольшее видовое разнообразие наземных моллюсков отмечено в прибрежье озера Кукай (12 видов). Прибрежный участок характеризуется повышенной увлажненностью почвы и затененностью, что создает благоприятные условия для развития наземных моллюсков. Низкое видовое разнообразие наземной малакофауны в вишарнике (9 видов) и березовых колках (8 видов) может быть обусловлено пониженной влажностью и относительно открытыми участками обитания.

Согласно зоогеографическому районированию континентальных водоёмов [8, 15], водные объекты исследуемого региона находятся на границе Средне-Волжской и Иртышской провинций, относящихся к Северо-Европейской надпровинции Европейско-Центрально-Азиатской подобласти Палеарктической области.

Виды, указанные по оригинальным и литературным данным для исследуемого региона, отнесены нами к 4 долготным группам (рис. 1). В Троицком заказнике основу фауны пресноводных брюхоногих моллюсков составляют европейско-сибирские зоогеографические элементы (76%), треть которых – виды с европейско-западносибирским распространением. Несколько меньший вклад вносят широкоареальные виды (голарктические и космополитные) и составляют 14,5% от всего объема фауны. Другие моллюски, такие как *Planorbis carinatus* (O. F. Müller, 1774) и *Stagnicola callomphala* (Servain, 1881), встречаются в Европе и проникают далеко по ее восточным областям, достигая при этом разных рубежей (составляют 9,5% от общего состава фауны).

Согласно схеме зоогеографического районирования наземной биоты [6], наземные моллюски исследуемого региона относятся к степной провинции Европейско-Сибирской подобласти Палеарктической области. Виды, указанные по оригинальным и литературным данным для исследуемого региона, отнесены нами к 5 долготным группам (рис. 2). Ядро фауны наземных брюхоногих моллюсков исследуемого региона составляют голарктические элементы (35,8% от общего объема фауны). Несколько меньший вклад вносят виды с европейско-сибирским распространением (28,6%). Два вида, *Columella edentula* (Draparnaud, 1805) и *Cochlicopa lubrica* (O.F.Müller, 1774), распространены в европейско-сибирском регионе и встречаются на Курильских островах. Мы предварительно относим их к европейско-сибирским элементам за неимением лучшего решения. Виды, характеризующиеся палеарктическим распространением, составляют 21,4% от общего состава. Наконец, некоторую роль в наземной фауне региона играют европейский вид *Vertigo moulinsiana* (Druyu, 1849) и сибирский вид *Gastrocopta theeli* (Westerlund, 1877), на долю которых приходится по 7,1%.

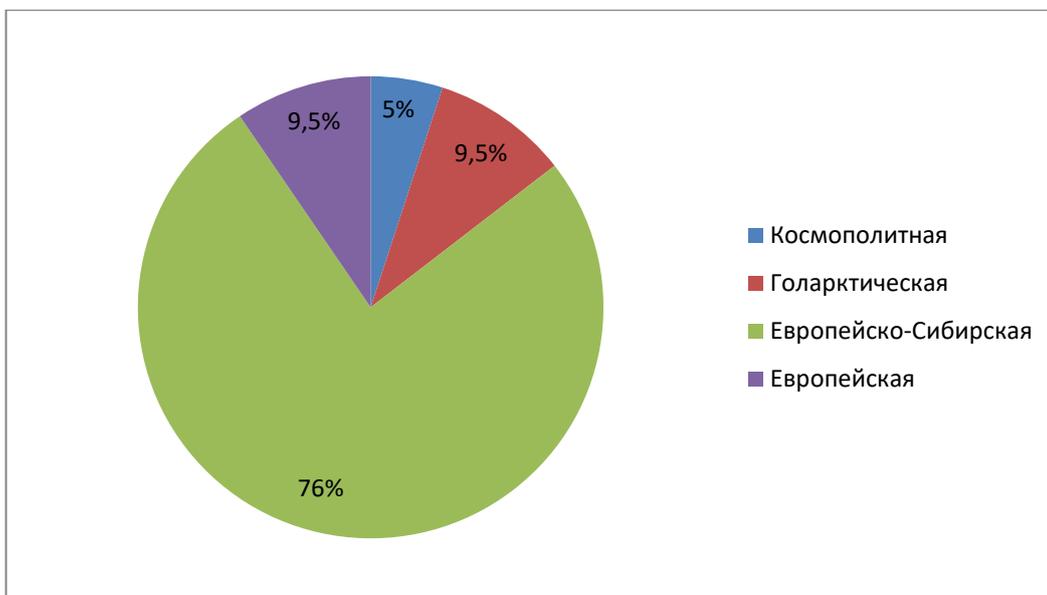


Рис. 1 Зоогеографические группировки пресноводных брюхоногих моллюсков Троицкого заказника и его окрестностей.

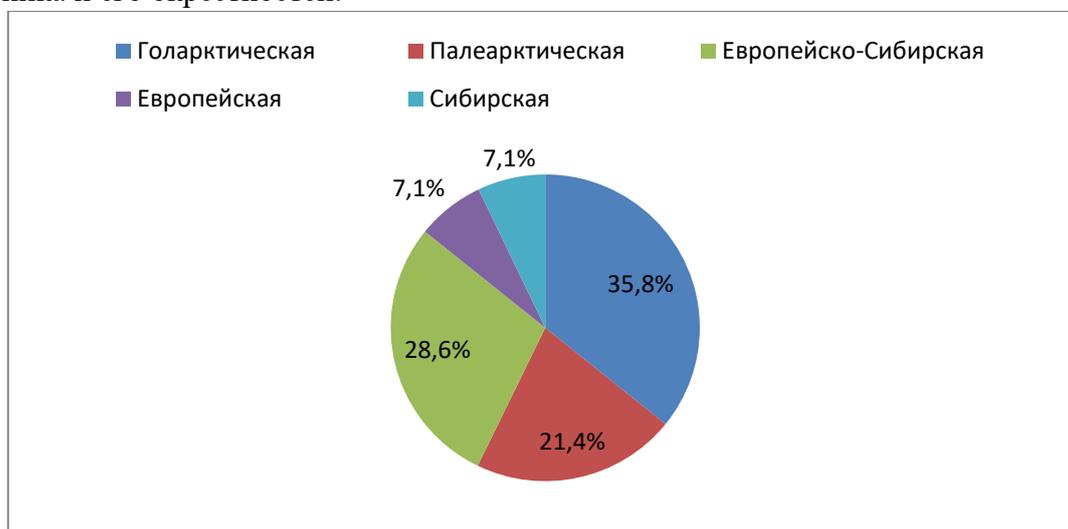


Рис. 2 Зоогеографические группировки наземных брюхоногих моллюсков Троицкого заказника и его окрестностей.

В зоогеографическом отношении фауны пресноводных и наземных моллюсков рассматриваемого региона носят смешанный характер с преобладанием европейско-сибирских и голарктических элементов соответственно.

В формировании фауны пресноводных гастропод существенный вклад вносят европейско-сибирские виды, что, вероятно, связано с расположением исследуемых водных объектов на границе Средне-Волжской и Иртышской провинций. Основу наземной малакофауны составляют широкоареальные виды (голарктические и палеарктические), обладающие климатической толерантностью и экологической пластичностью. Кроме широко распространенных видов, наземная малакофауна представлена европейско-сибирскими, европейскими и сибирскими элементами, что, вероятно, связано с расположением исследуемого региона на стыке Южного Урала, Приуралья и Сибири.

Современный зоогеографический состав наземной и пресноводной фаун гастропод исследуемого региона, их смешанный состав, вероятно, определяются пограничным

положением региона и ходом геологического развития, влиянием плейстоценовых оледенений и возникновением межбассейновых связей в послеледниковые периоды.

Благодарю за помощь в определении материала и подготовку иллюстраций научного консультанта Овчанкову Н.Б.

Библиографический список

1. Гиляров, М.С. Методы почвенно-зоологических исследований. М.: Наука, 1975. 274 с.
2. Жадин В.И. Пресноводные моллюски СССР. Л.: Ленснабтехиздат, 1933. 232 с.
3. Жадин В. И. Методы гидробиологического исследования. М.: Высшая школа, 1960. 150 с.
4. Кияшко П. В., Солдатенко Е.В., Винарский М.В. Брюхоногие моллюски // Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 2. Зообентос / под ред. В.Р. Алексеева и С.Я. Цалолихина. М–СПб: Товарищество научных изданий КМК, 2016. С. 335–438.
5. Лешко Ю.В. Моллюски. Фауна Европейского Северо-Востока России. Т. 5. Ч. 1. СПб: Наука, 1998. 168 с.
6. Лихарев И. М., Раммельмейер Е. С. Наземные моллюски фауны СССР. В серии: Определители по фауне СССР. 1952. Вып. 43. 511 с.
7. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов / под ред. Ф.Д. Мордухай-Болтовского. М.: Наука, 1975. 240 с.
8. Старобогатов Я.И. Фауна моллюсков и зоогеографическая характеристика фауны моллюсков в континентальных водоемах. Л., 1970. 372 с.
9. Старобогатов Я. И. Класс брюхоногие моллюски *Gastropoda*. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР. Л.: Еидрометиздат, 1977. С. 152-174.
10. Старобогатов Я. И., Прозорова Л. А., Богатов В. В., Саенко Е. М. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. СПб.: Наука, 2004. Т. 6. 528 с.
11. Хохуткин И. М., Винарский М. В., Гребенников М. Е. Моллюски Урала и прилегающих территорий. Семейство Прудовиковые *Lymnaeidae* (*Gastropoda*, *Pulmonata*, *Lymnaeiformes*). Екатеринбург: Гощицкий, 2009. Ч. 1. 156 с.
12. Хохуткин И. М., Винарский М. В. Моллюски Урала и прилегающих территорий. Семейства *Acroloxidae*, *Physidae*, *Planorbidae* (*Gastropoda*, *Pulmonata*, *Lymnaeiformes*). Екатеринбург: Гощицкий. 2013. Ч. 2. 184 с.
13. Glöer P. Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas. Die Tierwelt Deutschlands, ConchBooks, Hackenheim. 2002. 326 p.
14. Glöer P., & Meier-Book, C. Süßwassermollusken. Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland. Neubearbeitete Auflage. Hamburg. (Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung). 2003. P. 1-134.
15. Kruglov N. D., Starobogatov Ya. I. Guide to recent molluscs of northern Eurasia. Annotated and illustrated catalogue of species of the family *Lymnaeidae* (*Gastropoda Pulmonata Lymnaeiformes*) of Palaearctic and adjacent river drainage areas. Part 1. Ruthenica, 1993. Vol. 3, №. 1. P. 65–92.
16. Piechocki A., Wawrzyniak-Wydrowska B. Guide to freshwater and marine Mollusca of Poland. 2016. 280 p.
17. Vinarski M.V., Kantor Y.I. Analytical catalogue of fresh and brackish water molluscs of Russia and adjacent countries. Moscow: A.N.Severtsov Institute of Ecology and Evolution of RAS, 2016. 544 p.

18. Voode M. Taxonomic status of *Pisidium amnicum* (Müller, 1774) and *P. inflatum* Megerle von Mühlfeld in Porro. 2017. (Mollusca: Bivalvia: Sphaeriidae). 27(1): 39-49 p.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА *StpA* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ФАКТОРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ

Хаова Е.А., Ткаченко А.Г.

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

Ключевые слова: полиаминовый модулон, глобальные транскрипционные факторы *StpA* и H-NS

В естественных условиях обитания микроорганизмов нормальными для них являются переходные состояния между ростом и его отсутствием, обусловленные различными видами голодания и другими стрессорными воздействиями [1]. Это является одной из причин развития персистенции, придающей клеткам микроорганизмов физиологическую толерантность к различным видам неблагоприятных воздействий. Наиболее полно бактериальная персистенция изучена в отношении действия антибиотиков. Известно, что персисторы – это малочисленная субпопуляция клеток, которые находятся в дормантном состоянии, т.е. характеризуются замедленным метаболизмом и отсутствием роста и деления. Благодаря этому, такие клетки не имеют мишеней для воздействия антибиотиков, нарушающих ростовые процессы, и поэтому обладают множественной толерантностью к антибиотикам ненаследственной природы. Поэтому после снятия воздействия антибактериального препарата персисторы способны возвращаться в исходное вегетативное состояние и возобновлять рост. В связи с этим, персисторные клетки являются основной причиной рецидивов инфекционных заболеваний [2, 3].

Нами изучено участие в регуляции персистенции *Escherichia coli* ряда полиамин-зависимых генов, относящихся к механизмам общего стрессорного ответа: гена *spoT*, вместе с *relA* кодирующих (p)ppGpp-синтетазы (стринджен-факторы), гена *rpoS*, кодирующего ключевой регулятор стресс-индуцируемого регулона стационарной фазы, а также генов *rmf* и *yqjD*, кодирующих факторы гибернации рибосом. Активность исследуемых генов совпадает с возрастанием уровня персистенции родительского штамма и наибольшим отрицательным эффектом делеционных мутантов, а также с максимальной модуляцией генной экспрессии полиаминами [4, 5, 6]. По-видимому, в условиях стресса полиамины стимулируют формирование персисторов через модуляцию экспрессии «генов персистенции». В этом отношении нас заинтересовал ген *stpA*, кодирующий ДНК-связывающий белок, являющийся одним из глобальных транскрипционных регуляторов [7].

Исследования проводили в условиях периодического культивирования на полноценной среде LB и минимальной среде M9 (+0,4% глюкоза). Экспрессия *stpA* на транскрипционном уровне изучена на полноценной среде LB на штамме *Escherichia coli* дикого типа BW25141 методом ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией. Полученные данные нормализованы методом ΔC_t с использованием гена «домашнего хозяйства» *rpoZ* в качестве референсного. Экспрессию на трансляционном уровне исследовали с использованием репортерного слияния *stpA::lacZ*, сконструированного нами методом Simons R.W. et al. [8]. Полученное слияние перенесено

методом трансдукции в хромосому штамма BW25141, а также в полиамин-дефицитный штамм HT306A для изучения влияния полиаминов на экспрессию.

Известно, что *StpA* является паралогом ДНК-связывающего белка H-NS, являющегося одним из главных компонентов нуклеоида, и функционирует в виде гетеродимера совместно с данным белком. Также есть данные, что *StpA* может существовать и самостоятельно в виде гомодимера [7, 9]. Нами исследована экспрессия данных факторов на транскрипционном уровне (рис. 1). Согласно полученным результатам, уровень мРНК обоих факторов возрастает в экспоненциальной фазе и достигает максимального значения на 8 ч культивирования при переходе бактериальной культуры в стационарную фазу роста, когда клетки сталкиваются со стрессорными условиями, в результате чего происходит перестройка генно-экспрессионного профиля клетки, ответственного за формирование адаптивного состояния [1]. В этой «перестройке» могут участвовать также упомянутые глобальные транскрипционные факторы. В этот же период происходит возрастание количества персистеров в бактериальной популяции [2, 3].

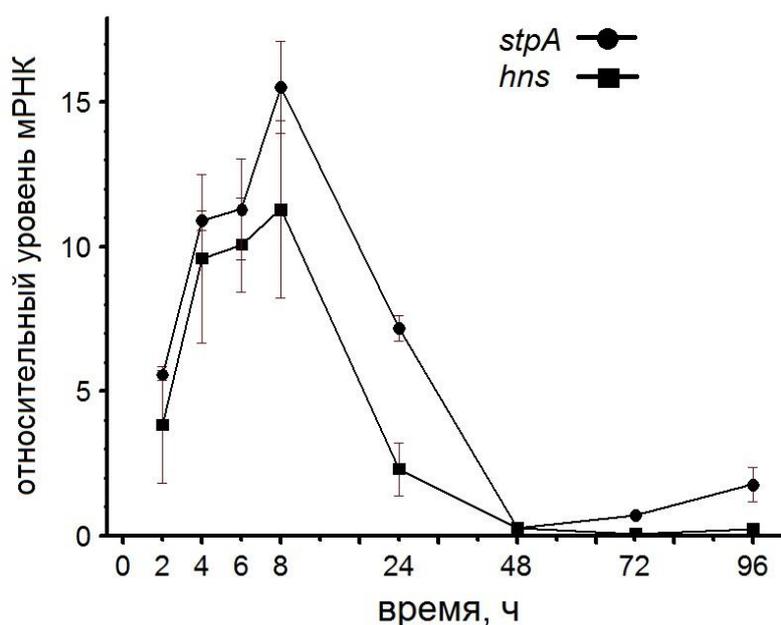


Рис. 1. Экспрессия *stpA* и *hns* на транскрипционном уровне.

Ранее считалось, что *StpA* играет роль резервной копии H-NS, однако по мере накопления исследований, уточняющих функции *StpA*, данному фактору стала отводиться более самостоятельная роль [10]. Нами проведены исследования экспрессии *stpA* на транскрипционном уровне с использованием полноценной среды LB и минимальной среды M9 (+0,4% глюкоза) (рис. 2). Согласно результатам исследования, экспрессия *stpA* на полноценной среде имеет значительно более низкий уровень и носит кратковременный характер. Наблюдается пик экспрессии в середине экспоненциальной фазы (на 4 ч культивирования), далее активность фактора резко снижается и находится на низком уровне в течение всей стационарной фазы. Интересно, что аналогичные результаты ранее опубликованы в отношении экспрессии *stpA* на транскрипционном уровне [10]. Известно, что нуклеоид-связывающий белок H-NS может ингибировать транскрипцию *stpA* [11], с чем может быть связана низкая экспрессия гена. Однако наличие кратковременной индукции экспрессии указывает на то, что некоторые условия окружающей среды могут активировать экспрессию *stpA*. На минимальной среде M9 (+0,4% глюкоза) экспрессия *stpA* более устойчива, длительна, находится на высоком постоянном уровне в течение всей

стационарной фазы. Согласно литературным данным, *stpA* находится под влиянием ДНК-связывающего транскрипционного регулятора Lrp, который перекрывает действие H-NS при культивировании на минимальной среде [10]. Активность Lrp зависит от присутствия лейцина в среде. На минимальной среде в отсутствие лейцина Lrp активирует экспрессию различных факторов [12], в том числе *stpA*. Нами также исследована экспрессия *stpA* в условиях осмотического шока и аммонийного голодания (рис. 3). Исследования были проведены на минимальной среде М9 (+0,4% глюкоза). Для изучения осмотического шока на 5 ч культивирования добавляли в среду 0,5 М NaCl. При исследовании аммонийного голодания использовали среду с пониженной концентрацией NH₄Cl 0,25 г/л. При этом с 5 ч культивирования наблюдалась остановка роста бактериальной культуры в связи с исчерпанием ионов аммония. В это же время значительно снижается экспрессия *stpA* по сравнению с контролем как при осмотическом шоке, так и при аммонийном голодании.

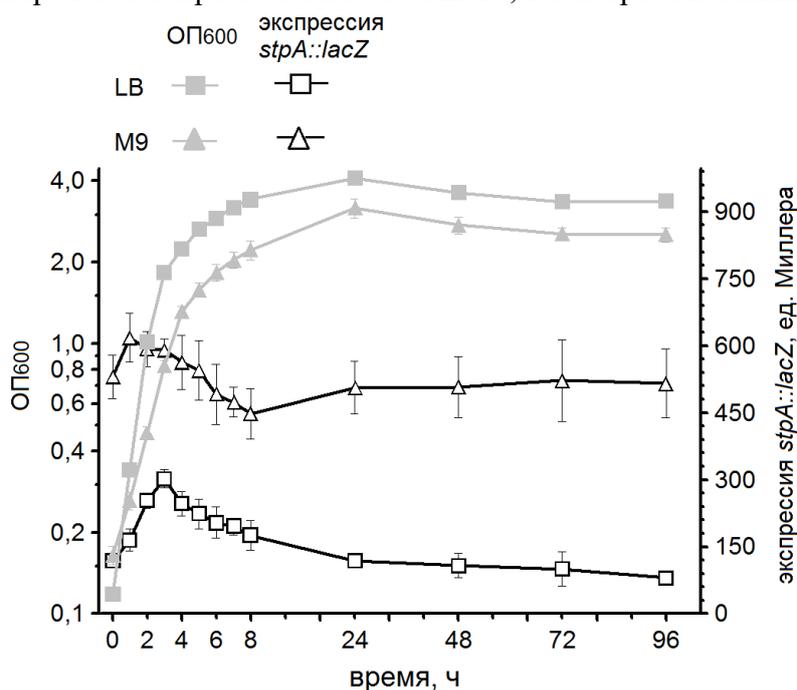


Рис. 2. Экспрессия *stpA* на трансляционном уровне на полноценной среде LB и на минимальной среде М9 (+0,4% глюкоза).

Известно, что полиамины участвуют в регуляции жизненных процессов у бактерий [13]. При физиологических условиях эти поликатионные соединения способны взаимодействовать с отрицательно заряженными биомолекулами, в том числе с ДНК, что позволяет полиаминам регулировать генную экспрессию. Гены, экспрессия которых стимулируется полиаминами, составляют полиаминовый модулон. Выделяют 4 механизма модуляции генной экспрессии полиаминами. 1. В случае, когда расстояние между последовательностью Шайна-Дольгарно и старт-кодоном больше оптимального, полиамины за счет введения изгиба в структуру ДНК укорачивают эту дистанцию, подгоняя под оптимальные значения для более эффективной трансляции. По данному механизму происходит регуляция экспрессии *hns*. 2. Полиамины способствуют узнаванию рибосомальным комплексом минорных стар-кодонов. 3. Полиамины предотвращают преждевременную терминацию трансляции при нонсенс-мутациях путем супрессии релизинг-факторов или +1-сдвига рамки считывания.

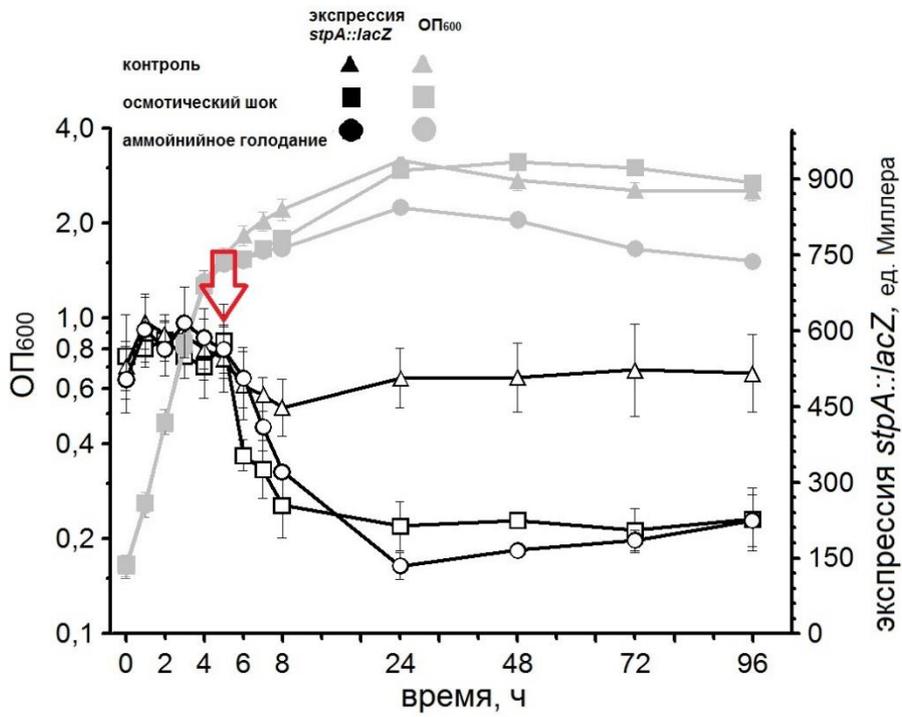


Рис. 3. Экспрессия *strA* при осмотическом шоке и аммонийном голодании.

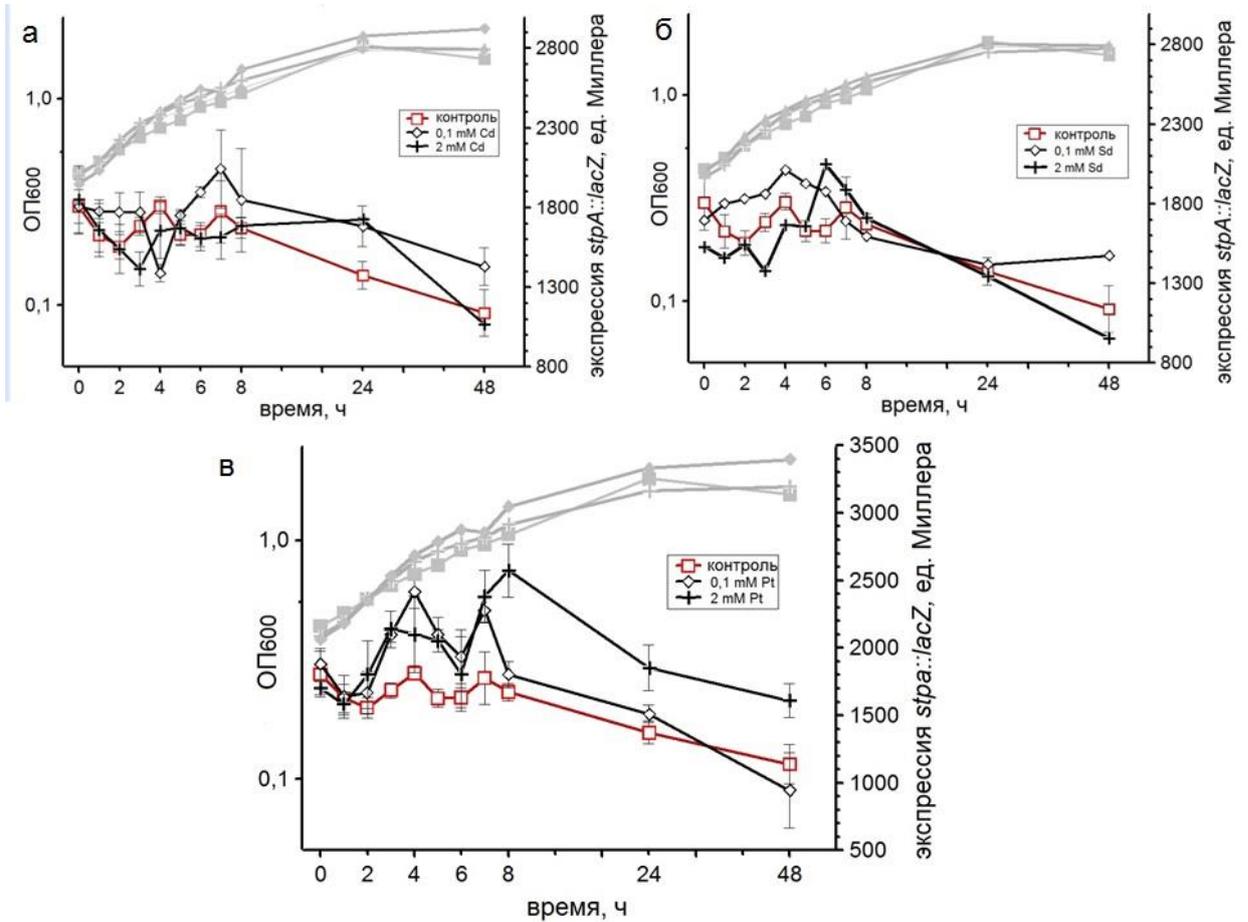


Рис. 4. Влияние полиаминов кадаверина (а), спермидина (б), путресцина (в) на экспрессию *strA*.

4. Полиамины могут регулировать экспрессию на трансляционном уровне посредством взаимодействия со вторичными структурами мРНК [14]. Известно, что у гена *stpA* последовательность Шайна-Дольгарно удалена от старт-кодона на 12 нуклеотидов, в то время как оптимальным расстоянием является 7 нуклеотидов [15]. Это указывает на потенциальную принадлежность гена *stpA* к полиаминовому модулю. Нами изучено влияние полиаминов на экспрессию *stpA* на минимальной среде М9 (+0,4% глюкоза) с добавлением полиаминов путресцина, кадаверина, и спермидина в концентрациях 0,1 мМ и 2 мМ. Результаты исследования демонстрируют, что полиамины стимулируют экспрессию *stpA*. При этом наиболее значительный эффект оказывает путресцин. Наибольшая стимуляция экспрессии путресцином наблюдается в экспоненциальной фазе на 4 ч культивирования, а также в течение всей стационарной фазы. В отличие от этого, кадаверин и спермидин оказывают незначительное влияние (рис. 4).

Таким образом, экспрессия *stpA* значительно выше на минимальной среде, чем на полноценной, что связано с влиянием транскрипционного фактора Lrp. Наиболее эффективная стимуляция экспрессии *stpA* путресцином наблюдается в стационарной фазе, что может служить основанием для отнесения данного гена к полиаминовому модулю. При осмотическом шоке и аммонийном голодании экспрессия *stpA* значительно снижается.

Работа выполнена в рамках государственного задания (номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290001).

Библиографический список

1. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. - Екатеринбург: УрО РАН. - 2012. - 268 с.
2. Lewis K. Persister cells//Annual Reviews of Microbiology. - 2010. - V. 64. - P. 357-372.
3. Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D. I., Brynildsen M. P., Bumann D., Camilli A., Collins J. J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J.- M., Hardt W.- D., Harms A., Heinemann M., Hung D. T., Jenal U., Levin B. R., Michiels J., Storz G., Tan M.- W., Tenson T., Melderer L., Zinkernagel A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence//Nature Reviews. Microbiology. - 2019. – V. 17. - №7. – P. 441-448.
4. Tkachenko A., Kashevarova N., Karavaeva E., Shumkov M. Putrescine controls the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin//FEMS Microbiology Letters. 2014. - V. 361. - №1. P.1-9.
5. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Tyuleneva E.A., Shumkov M.S. Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin//FEMS Microbiology Letters. 2017. - V. 364. - №9. - P. 1–9.
6. Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Шумков М.С., Сидоров Р.Ю., Ткаченко А.Г. Роль генов общего стрессорного ответа в формировании бактериальной персистенции//Вестник Пермского университета. Серия Биология. - 2018. - Вып. 4. - с. 393-401.
7. Johansson J., Eriksson S., Sonden B., Wal S., Uhlin B. Heteromeric Interactions among Nucleoid-Associated Bacterial Proteins: Localization of StpA-Stabilizing Regions in H-NS of *Escherichia coli*//Journal of Bacteriology. - 2001. - V. 183. - №7. - P. 2343-2347.
8. Simons R.W., Houman F., Kleckner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions//Gene. - 1987. - V. 53. - №1. - P. 85-96.
9. Williams R.M., Rimsky S. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks//FEMS Microbiology Letters. 1997. - V. 156. - №2. - P. 175-185.
10. Free A., Dorman C.J. The *Escherichia coli stpA* Gene Is Transiently Expressed during Growth in Rich Medium and Is Induced in Minimal Medium and by Stress Conditions//JOURNAL OF BACTERIOLOGY. – 1997. – V. 179. - №3. – P. 909-918.

11. Dorman C.J., Hinton J.C.D., Free A. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria//Trends in Microbiology. - 1999. - V. 7. - №3. - P. 124-128.

12. Calvo J.M., Matthews R.G. The Leucine-Responsive Regulatory Protein, a Global Regulator of Metabolism in *Escherichia coli*//MICROBIOLOGICAL REVIEWS. – 1994. – V. 58. - №3. – P. 466-490.

13. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms//Microbiological Reviews. - 1985. V. 49. - №1. - P. 81-99.

14. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines//The International Journal of Biochemistry&Cell Biology. - 2010. - V. 42. - №1. - P. 39-51.

15. Zhang A., Belfort M. Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein//Nucleic Acids Research. – 1992. - V. 20. - №24. – P. 6735.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ХЕЛАТОВ ЕВРОПИЯ

Храмцов П.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, «ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь, Россия

Ключевые слова: альбумин, европий, наночастицы

Флуоресцентные метки используют в биоимаджинге, проточной цитометрии, клинической лабораторной диагностике при выявлении онкомаркеров, аллергенов, аутоантител и др. [1].

Флуоресцировать могут многие молекулы, присутствующие в живых организмах, например, белки и пигменты [2]. Аутофлуоресценция является источником фонового сигнала при проведении анализов и снижает их чувствительность. Для снижения влияния аутофлуоресценции используют молекулы, обладающие различными флуоресцентными свойствами, в частности способностью излучать в ближнем ИК-диапазоне, ап-конверсией, а также длительной флуоресценцией [3-5].

Был разработан метод синтеза флуоресцентных наночастиц, состоящих из бычьего сывороточного альбумина и хелатированных катионов европия. Флуоресцентные наночастицы споосбны к длительной флуоресценции с узким пиком эмиссии в области 620 нм.

Исследование выполнено в рамках государственного задания НИОКТР АААА-А19-119112290010-7 «Поиск и селекция биотехнологически перспективных микроорганизмов и создание иммунохимических диагностических систем»

Библиографический список

1. Fang X., Zheng Y., Duan Y., Liu Y., Zhong W. Recent Advances in Design of Fluorescence-based Assays for High-throughput Screening // Analytical Chemistry. – 2019. – V. 91. – № 1. – P. 482-504.

2. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications // Biotechnology Annual Review. – 2005. – V. 11. – P. 227-256.

3. Zhao J., Zhong D., Zhou S. NIR-I-to-NIR-II fluorescent nanomaterials for biomedical imaging and cancer therapy // Journal of Materials Chemistry B. – 2018. – V. 6. – № 3. – P. 349-365.

4. Chatterjee D., Rufaihah A., Zhang Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29. – № 7. – P. 937-943.

5. Cardoso Dos Santos M., Goetz J., Bartenlian H., Wong K.-L., Charbonnière L. J., Hildebrandt N. Autofluorescence-Free Live-Cell Imaging Using Terbium Nanoparticles // *Bioconjugate Chemistry*. – 2018. – V. 29. – № 4. – P. 1327-1334.

РАЗЛИЧНЫЕ СПОСОБЫ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ МЕТОДОМ ДЕСОЛЬВАТАЦИИ, МОГУТ ДАВАТЬ ОШИБОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Храмцов П.В., Калашникова Т.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, «ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь, Россия

Ключевые слова: альбумин, желатин, наночастицы, десольватация, бицинхониновая, Бредфорд

Белковые наночастицы обладают существенным потенциалом для использования в различных отраслях экономики: медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, науке о материалах. В частности, существуют многочисленные примеры белковых наночастиц в качестве носителей в биоимаджинге, в адресной доставке противоопухолевых лекарств, радиопротекторов, противомикробных препаратов, вакцин [1, 2]. В пищевой промышленности белковые наночастицы используются в качестве стабилизаторов эмульсий [3], компонентов упаковочных материалов [4], контейнеров для нутриентов [5].

Метод десольватации широко используется для синтеза наночастиц из полимеров, в том числе и из белков. Он состоит в добавлении плохого растворителя (этанола, метанола, ацетона, хлороформа т. д.) к раствору белка, что приводит к резкому снижению растворимости белка и агрегации его молекул, что приводит к образованию наночастиц. Для стабилизации молекулы белка в составе наночастиц сшивают при помощи бифункциональных реагентов: альдегида, карбодиимида, генипина и т.д.

Целью работы было сравнение различных методов оценки концентрации белковых наночастиц, синтезированных методом десольватации, и выявление причин, которые могут привести к ошибочным результатам при использовании этих методов. Мы сравнивали следующие методы оценки концентрации наночастиц: гравиметрический анализ, кислотный/щелочной гидролиз, колориметрические методы, а именно метод определения белка по Бредфорд, метод определения белка с использованием бицинхониновой кислоты (BCA).

Были получены следующие результаты:

1. Точность оценки концентрации наночастиц зависит от степени сшивки белков бифункциональным агентом. При высокой степени сшивки прямое определение концентрации белка в суспензии наночастиц колориметрическими методами приводит к заниженным значениям относительно истинного значения.

2. При снижении выхода реакции десольватации (когда лишь небольшой процент белка превращается в наночастицы), косвенное определение концентраций наночастиц по количеству свободного белка в супернатантах приводит к переоценке концентрации относительно истинного значения.

3. Щелочной гидролиз (в 4 М растворе NaOH) был более эффективен, чем кислотный гидролиз, который приводил к образованию нерастворимых агрегатов. При применении щелочного гидролиза калибровочная кривая должна быть построена с использованием раствора белка, обработанного сшивающим реагентом.

Исследование выполнено в рамках государственного задания НИОКТР АААА-А19-119112290010-7 «Поиск и селекция биотехнологически перспективных микроорганизмов и создание иммунохимических диагностических систем»

Библиографический список

1. Hong S., Choi D.W., Kim H.N., Park C.G., Lee W., Park H.H. Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems // *Pharmaceutics*. – 2020. – V. 12. – № 7. – art. no. 604.

2. Deng L., Chang T.Z., Wang Y., Li S., Wang S., Matsuyama S., Yu G., Compans R.W., Li J.D., Prausnitz M.R., Champion J.A., Wang B.Z. Heterosubtypic influenza protection elicited by double-layered polypeptide nanoparticles in mice // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2018. – V. 115. – № 33. – P. E7758-E7767.

3. Feng X., Dai H., Ma L., Yu Y., Tang M., Li Y., Hu W., Liu T., Zhang Y. Food-Grade Gelatin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Preliminary Application for Stabilizing Pickering Emulsions // *Foods*. – 2019. – V. 8. – № 10. – art. no. 479.

4. Cho Y.H., Jones O.G. Assembled protein nanoparticles in food or nutrition applications // *Advances in Food and Nutrition Research*. – 2019. – V. 88. – P. 47-84.

5. Mohammadian M., Waly M. I., Moghadam M., Emam-Djomeh Z., Salami M., Moosavi-Movahedi A. A. Nanostructured food proteins as efficient systems for the encapsulation of bioactive compounds // *Food Science and Human Wellness*. – 2020. – In press.

ПОЛИАМИНЫ СПОСОБСТВУЮТ ИЗМЕНЕНИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ МИКОБАКТЕРИЙ

Цыганов И.В.^{1,2}, Нестерова Л.Ю.^{1,2}, Ткаченко А.Г.^{1,2}

¹ФГБУН ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов», г. Пермь, Россия.

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия.

Ключевые слова: биопленкообразование, биогенные полиамины, скольжение, *Mycobacterium smegmatis*.

Изучение свойств поверхности бактериальной клетки представляет большой интерес для исследователей, ввиду того, что с данной структурой связано множество жизненно важных процессов микроорганизмов: обмен веществ с окружающей средой, ориентация в пространстве, перемещение и межклеточное взаимодействие, посредством которого бактерии способны организованно реагировать на действия окружающей среды. Состояние клеточной поверхности в числе прочего определяет чувствительность к различным неблагоприятным воздействиям, в том числе к антибиотикам. В свою очередь, на свойства поверхностных структур клеток способны оказывать влияние вещества, присутствующие в окружающей среде, в том числе метаболиты других бактерий или тканей макроорганизма. Одним из таких факторов являются биогенные полиамины – алифатические углеводороды, имеющие в своём составе положительно заряженные амино- и иминогруппы. Данные поликатионы присутствуют в клетках и тканях большинства живых организмов [1], а, следовательно, они могут участвовать в формировании окружающей среды для симбионтных и патогенных форм микроорганизмов. Полиамины способны

взаимодействовать с молекулами, обладающими отрицательным зарядом, и принимать участие в модулировании физиологических процессов в клетках. Установлено, что полиамины оказывают влияние на проницаемость клеточной стенки, репликацию, и экспрессию множества генов [2]. Кроме того, экзогенные молекулы полиаминов могут взаимодействовать с отрицательно заряженными поверхностными структурами бактерий, и таким образом влиять на способность к адгезии и другие процессы, ответственные за проницаемость, подвижность или чувствительность к антибиотикам. Исследование изменения чувствительности микобактерий к антибиотикам представляет особый интерес, поскольку *Mycobacterium tuberculosis* является возбудителем туберкулеза человека. Согласно данным ВОЗ, туберкулез входит в десятку наиболее распространенных причин смертности в мире. Более того, риск развития данной болезни имеется примерно у четверти населения Земли [3]. Помимо этого, в последнее время растет частота заболеваний микобактериозами [4]

В связи с этим целью работы было изучение влияния биогенных полиаминов на поверхностные свойства клеток микобактерий.

МЕТОДЫ. В качестве объекта исследования использован штамм *Mycobacterium smegmatis* mc² 155.

Для определения влияния полиаминов на биопленкообразование определяли удельное биопленкообразование по методике Naves (2008) [5]. Для количественной оценки поверхностного биопленкообразования удаляли планктонную культуру, так чтобы поверхностные пленки оставались в лунках планшета. Значение удельного поверхностного биопленкообразования определяли как разность общего и придонного удельного биопленкообразования.

Плотность колонии определяли как отношение числа клеток в колонии к её площади.

Степень гидрофобности поверхности бактериальных клеток оценивали по адгезии к гексадекану с использованием МАН-теста [6].

О поверхностном заряде бактериальных клеток судили по величине дзета-потенциала, который определяли с помощью анализатора размера частиц Zetasizer nano ZS ("Malvern Instruments", Великобритания).

Для характеристики размера агрегатов определяли площадь проекции агрегата на плоскость.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Микобактериям, из-за отсутствия у них жгутиков, недоступно плавание или роение. Тем не менее, они способны к скольжению – коллективному перемещению по полужидким поверхностям за счет экспансивной силы [7]. Для исследования влияния путресцина, кадаверина, спермидина и спермина на скольжение, гидрохлориды этих соединений добавляли в не застывшую среду таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 0,1, 1 и 5 мМ. Установлено, что в использованных концентрациях они не влияли на ростовые характеристики *M. smegmatis*, но ограничивали скольжение и, как следствие, уменьшали размер скользящих колоний. Статистически значимый эффект наблюдался в присутствии спермидина и спермина. Максимальная использованная концентрация спермидина вызывала уменьшение диаметра колонии на 20%, а спермин в максимальной концентрации уменьшал диаметр скользящей колонии в среднем более чем в 2 раза.

Поскольку скольжение зависит от гликопептидолипидов, расположенных на поверхности клеток и создающих гидрофобную среду, можно предположить, что полиамины способны менять степень гидрофобности клеточной поверхности. Тем не менее, в присутствии полиаминов в концентрации 2 мМ статистически значимых изменений показателя, характеризующего гидрофобность/гидрофильность клеточной

поверхности, обнаружить не удалось. В то же время в присутствии биогенных полиаминов той же концентрации значительно изменялся дзета-потенциал клеток. Наибольшее действие на данный параметр оказывали спермидин и спермин, в присутствии которых отрицательный заряд повышался с -24,80 mV до -15,15 mV и -10,95 mV соответственно. Величина дзета-потенциала определяет устойчивость коллоидных систем, к которым можно отнести и культуры микроорганизмов в жидкой среде. Снижение дзета-потенциала (по модулю) приводит к потере стабильности системы. Для бактерий это может сопровождаться усилением агрегации.

Для оценки изменений взаимодействия между клетками была исследована степень агрегации микобактерий и их способность к биопленкообразованию в присутствии полиаминов. Добавление в среду полиаминов увеличивало размер агрегатов в 1,5-2 раза. Эффект возрастал в ряду путресцин-кадаверин-спермидин-спермин.

Полиамины спермидин и спермин статистически значимо увеличивали придонное биопленкообразование, (2 и 4 раза соответственно). Кроме того, эффект спермина зависел от его концентрации. На поверхностное биопленкообразование сильнее всего влияли кадаверин, спермидин и спермин в концентрации 2 мМ. При этом значения возрастали на 30-40%.

Поскольку бактерии в составе биопленки обладают повышенной устойчивостью к факторам иммунной системы и антибактериальным препаратам, присутствие полиаминов в среде может рассматриваться как фактор, способствующий выживанию и персистенции микобактерий. Во всех проведенных исследованиях наибольший эффект оказывали полиамины спермидин и спермин. Данные поликатионы имеют большее число положительно заряженных групп, чем путресцин и кадаверин. Это свидетельствует в пользу того, что эффект полиаминов связан с действием экзогенных молекул на поверхностные структуры клеток. Взаимодействие с поликатионами приводит к снижению величины отрицательного заряда клеток, что подтверждается изменением дзета-потенциала, и потерей устойчивости, сопровождающейся агрегацией частиц. Агрегация клеток отрицательно сказывается на способности микобактерий к скольжению, но в то же время может способствовать биопленкообразованию. Тем не менее, нельзя полностью исключить эффект полиаминов на генную экспрессию. Полиамины регулируют широкий спектр генов у грамотрицательных бактерий, ответственных, в том числе, за биопленкообразование и выживаемость [8]. Однако для работы подобной системы у микобактерий необходимо накопление в клетках больших концентраций полиаминов, чего на сегодняшний день у *M. smegmatis* не обнаружено [9].

Таким образом, биогенные полиамины изменяют свойства микобактерий, уменьшая поверхностный заряд клеток и способствуя образованию агрегатов. Это препятствует скольжению, но стимулирует биопленкообразование, ответственное за толерантность к противомикробным факторам. Сила действия полиаминов, прямо пропорциональна числу катионных групп в молекулах.

Библиографический список

1. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Tyuleneva E.A., Shumkov M.S. Stationary-phase genes upregulated by polyamines are responsible for the formation of *Escherichia coli* persister cells tolerant to netilmicin // FEMS Microbiol. Lett. – 2017. – V. 364. – № 9. – P. fnx084 1-9.
2. Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine Modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines // J. Biochem. – 2006. – V. 139. – № 1. – P. 11-16.
3. WHO. Global tuberculosis report 2019. Geneva, 2019.

4. Diaz M.A.A., Huff T.N., Libertin C.R. Nontuberculous mycobacterial infections of the lower extremities: A 15-year experience // J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis. – 2019. – V. 15. – P. 100091.
5. Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Dahbi G., Blanco M., del Carmen Ponte M., Soriano F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains // Microb. Pathog. – 2008. – V. 45. – № 2. – P. 86-91.
6. Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – V. 262. – № 2. – P. 129-134.
7. Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria // J. Bacteriol. – 1999. – V. 181. – № 23. – P. 7331-7338.
8. Igarashi K., Kashiwagi K. Characterization of genes for polyamine modulon // Methods Mol. Biol. – 2011. – V. 720. – P. 51-65.
9. Zamakhaev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. Mycolicibacterium smegmatis possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines // Int. J. Mycobacteriol. – 2020. – V. 9. – № 2. – P. 138-143.

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ ПРОДУКТОВ УСЛОВНО
ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-
МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ
LACTOBACILLUS SPP.**

Чедова Е.Е., Годовалов А.П.

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера, г. Пермь, Россия

Резюме. Изучено влияние экзопродуктов условно патогенных микроорганизмов (УПМ) *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Escherichia coli* на метаболическую активность клинических штаммов *Lactobacillus* spp., изолированных из влагалищного биотопа практически здоровых женщин. Изучали ростовые характеристики штаммов, продукцию молочной кислоты и утилизацию глюкозы. Показана разнородность ответа лактобактерий на секретируемые продукты ассоциативных микросимбионтов. Наибольший стимулирующий эффект оказывали метаболиты штаммов *C. albicans*, под влиянием которых большинство изученных штаммов лактобактерий активно продуцировали и молочную кислоту, и, возможно, перекись водорода. Представляется перспективным внедрение оценки метаболической активности лактобактерий в схему лабораторного исследования, поскольку такой подход позволит судить о благополучии состояния микробиоты.

Ключевые слова: метаболиты, молочная кислота, *Lactobacillus* spp.

Бактерии рода *Lactobacillus* играют важную роль в защите слизистых оболочек влагалищного биотопа от заселения патогенными и условно патогенными микроорганизмами (УПМ). Известно, что нормальную микрофлору формируют несколько видов лактобацилл, отличающихся по метаболическим возможностям [1]. Считается, что за счет продукции молочной кислоты, перекиси водорода и других метаболитов происходит регуляция численности других видов микроорганизмов [2,3].

Процесс заселения нижних отделов женских половых органов условно патогенными микроорганизмами подразумевает выработку ими метаболитов (бактериоцинов, бактериолизин, разного рода ферментов), которые обладают антагонистическим

действием в отношении других представителей микробиоты, в том числе нормофлоры влагалища [4,5]. Однако остается открытым вопрос о механизмах влияния метаболитов тех или иных условно патогенных микроорганизмов на функциональную активность доминантных микросимбионтов.

Цель – оценить влияние экстрацеллюлярных продуктов *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli* на функционально-метаболическую активность клинических изолятов *Lactobacillus* spp.

Материалы и методы. Для оценки метаболических характеристик представителей нормальной флоры влагалища, изучали ростовые и антагонистические свойства лактобацилл при взаимодействии с метаболитами экзогенной микрофлоры.

В качестве объектов исследования использовали клинические изоляты рода *Lactobacillus*, выделенные из цервико-вагинального содержимого практически здоровых женщин репродуктивного возраста, и музейные штаммы *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*. Штаммы *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* культивировали в мясо-пептонном бульоне при 37°C 24 часа. Секретируемые продукты отделяли от клеточной смеси путем центрифугирования суточной культуры (12 тыс. оборотов/мин). Отсутствие жизнеспособных клеток *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* в супернатантах оценивали путем посева на плотные питательные среды.

Лактобациллы культивировали в жидкой питательной среде МРС в микропробирках типа эппендорф объемом 1,8 мл при температуре 37°C в течение 96 часов с добавлением супернатантов УПМ в количестве 0,2 мл. Каждые 24 часа проводили отбор проб для оценки прироста биомассы бактерий, путем измерения оптической плотности образцов при 600 нм, концентрации молочной кислоты, а также уровня глюкозы энзиматическим колориметрическим методом. Выживаемость клинических штаммов определяли при посеве на Лактобакагар.

Результаты и обсуждение. Метаболиты ассоциативных микросимбионтов не оказывали значительного угнетающего действия на ростовые свойства клинических изолятов *Lactobacillus* spp. Лишь в трети случаев удлинялся период адаптации почти на 24 часа, а накопление биомассы было менее интенсивным, если в среде культивирования присутствовали экзометаболиты *E. coli*. Воздействие *S. aureus*, *C. albicans* не приводило к задержке стационарной фазы развития у изучаемых штаммов, тогда как *E. coli* тормозит процессы роста лактобактерий (рис. 1). Максимальный прирост биомассы у первых штаммов составил 1,5 и 1,6 у.е. соответственно, а для другой части достигал уровня 0,8 у.е.

При изучении влияния экстрацеллюлярных метаболитов на продукцию лактобактериями молочной кислоты, как основного бактерицидного фактора, были получены разнородные результаты. Треть клинических штаммов синтезировали молочную кислоту только в ответ на супернатанты культур *C. albicans*, где уровень лактата составил порядка 5,9 ммоль/л, что выше показателей контрольных проб (2,1 ммоль/л) (рис. 2). Интенсивность выработки молочной кислоты в ответ на метаболиты *C. albicans* разными штаммами доминантных микросимбионтов выражена неодинаково (тах уровень молочной кислоты от 8,7 до 12,6 ммоль/л) (рис. 3).

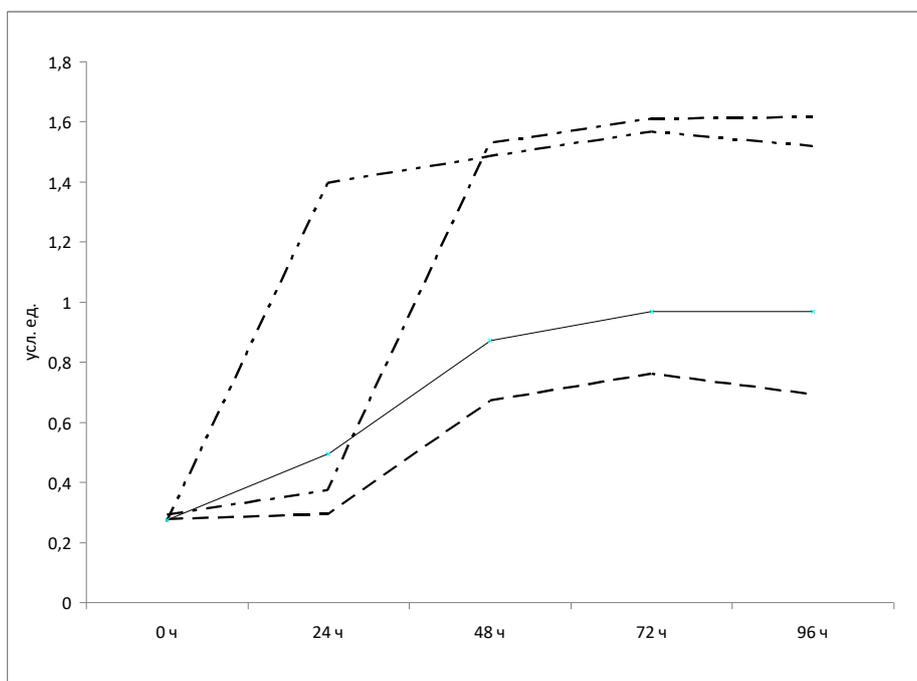


Рисунок 1. Влияние метаболитов *E. coli* на прирост биомассы клинических штаммов лактобактерий (сплошная линия - рост штаммов без экзометаболитов, разные типы пунктирной линии - типы влияния экзометаболитов на прирост биомассы у разных штаммов)

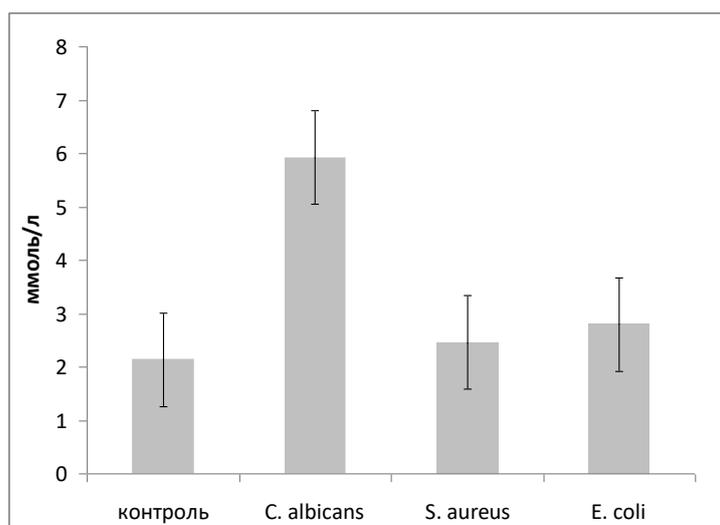


Рисунок 2. Средний накопленный уровень молочной кислоты одного из изолятов лактобактерий, ммоль/л.

Уровень утилизации глюкозы всеми исследуемыми доминантными микросимбионтами коррелировал с увеличением уровня молочной кислоты, что позволяет предположить зависимость продукции этого метаболита от наличия глюкозы в среде.

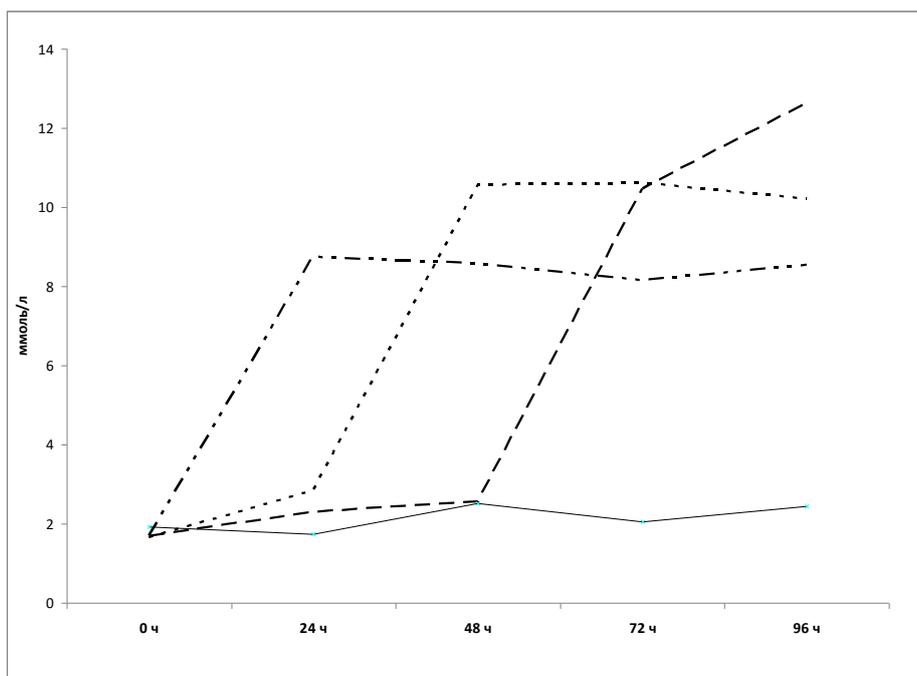


Рисунок 3. Влияние метаболитов *C. albicans* на продукцию молочной кислоты в динамике роста клиническими штаммами лактобактерий (сплошная линия - рост штаммов без экзометаболитов, разные типы пунктирной линии - типы влияния экзометаболитов на прирост биомассы у разных штаммов)

В ходе исследования более чем в половине случаев было отмечено вспенивание питательной среды, когда там присутствовали супернатанты культур *C. albicans*. Можно предположить, что подобный феномен обусловлен активной продукцией перекиси водорода бактериями рода *Lactobacillus*.

В целом, полученные результаты позволяют предположить, что предварительный и длительный контакт с тем или иным представителем условно патогенной микрофлоры приводит к расширению их адаптационного потенциала за счет более быстрой продукции антагонистических факторов.

Заключение. Таким образом, при микробиологическом исследовании содержимого вагинального биотопа представляется перспективным не только выявление лактобактерий, но и оценка их метаболических свойств. Такой подход позволяет оценить антагонистический потенциал этих микроорганизмов, что косвенно указывает на состояние микробиоты (благополучное или нет) и будет полезен при планировании лечебной тактики.

Библиографический список

1. Будилова О.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е. Н. и др. Видовое разнообразие вагинальных лактобацилл в норме и при дисбиотических состояниях// Журнал акушерства и женских болезней.- 2017. –Т.66. №2. – С. 24-32;
2. Николенко М.В., Барышникова Н.В., Мельникова Д.И. и др. Роль лактобактерий в микробиоценозе женского репродуктивного тракта, взаимодействие с другими бактериями при зубиозе// Фундаментальные и прикладные научные исследования, 2019;
3. Черкасов С.В., Семенов А. В. Микробная регуляция антагонистической активности лактобактерий// Сибирский медицинский журнал, 2012, № 2, с 78-81.
4. Бухарин О. В., Кремлева Е.А., Сгибнев А. В. И др. Роль доминантной микрофлоры в механизмах защиты вагинального биотопа женщин// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2013, № 6, С. 100—104;

5. Николенко М.В., Барышникова Н.В., Гойда М.Я, и др. Роль *Stafylococcus aureus* в микробиоценозе репродуктивного тракта женщин, взаимодействие с другими бактериями при дисбиозе// *Фундаментальные и прикладные научные исследования*, 2019;

ФАКТОРЫ, ФОРМИРУЮЩЕЕ ПОВЕДЕНИЕ ЛЕМУРОВ ВАРИ (*VARECIA*, *LEMURIDAE*) В НЕВОЛЕ

Черевко Л.С.

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет»
Барнаул, Россия

Ключевые слова: приматы, полуобезьяны, лемуры, поведение лемуров, содержание в неволе, *Varecia variegata variegata*, *Varecia variegata rubra*

Черно-белые и красные вари, как и многие представители фауны острова Мадагаскара, занесены в Красную книгу МСОП в статусе «критически угрожаемого вида». В такой ситуации наряду с мерами по сохранению лемуров вари в составе естественных экосистем, большие надежды возлагаются на искусственно сформированные группы лемуров в неволе, выступающие как возможный резерв природных популяций [1,2].

В то же время анализ литературы показал, что процесс подбора и формирования групп этих приматов имеет ряд проблем, которые выражаются неприятием отдельных особей членами группы, повышенной агрессивности особей друг к другу и травмировании в результате агрессии, нестабильным размножением, отказом самок выкармливать детенышей [2,3]. Однако данных по поведению в неволе недостаточно, чтобы сделать определенные выводы о причинах перечисленных особенностей поведения, т.к. исследования касаются преимущественно влияния средств обогащения среды на отдельные формы поведения и выполнены на небольшом числе животных.

Цель исследования – изучить влияние условий содержания на поведение черно-белых и красных лемуров вари. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- изучить агрессивное поведение;
- описать аффилятивное поведение лемуров вари;
- исследовать маркировочное поведение;
- изучить бюджеты времени и сравнить их с литературными данными для животных в естественных местообитаниях;

В каждой из перечисленных задач оценивали влияние различных факторов на изучаемые формы поведения.

Материал

Сбор материала осуществляли в летние месяцы в период с 2008 по 2018 г. Исследовано поведение 155 особей лемуров вари (66 особей *Varecia variegata variegata* и 89 особей *Varecia variegata rubra*) в возрасте от 6 мес до 24 лет, из них 62 самки и 93 самца. Животные содержались парами и группами до 14 особей. Всего изучено 33 группы, в том числе: 18 групп, включающих самцов и самок (11 смешанных групп с преобладанием самцов, 5 смешанных групп с преобладанием самок, 2 смешанные группы с одинаковым числом самцов и самок), 5 групп из одних самцов, 2 группы из одних самок и 9 пар (самец и самка). Давность существования групп лемуров на момент исследования составляла не менее одного года. Все лемуры были рождены в зоопарках.

Методы

Наблюдения проводились ежедневно в утренние, дневные и вечерние часы по следующим графикам: 7.00–11.00, 12.00–18.00, 19.00–22.00 или 8.00–12.00, 14.00–20.00. За каждой группой проведено от 72 до 320 ч наблюдений, всего более 5600 ч наблюдений. Исследование проводилось в летний период, исключение составила группа лемурув в зоопарке Нижнего Новгорода, которых изучали в январе.

При наблюдении за группами лемурув, которые содержались в больших уличных вольерах (от 300 м²), наблюдения проводились внутри вольера, в остальных случаях – снаружи, на расстоянии 1 м от ограждения. В маленьких группах животные распознавались визуально “в лицо”, в больших – были помечены (на белые участки шерсти наносились метки раствором бриллиантового зеленого).

Статистическую обработку проводили, применяя методы непараметрической статистики. Статистические расчеты проводились в программе SPSS Statistics 17.0.

Результаты

Агрессивное поведение.

Оценивали влияние на агрессивное поведение животных следующих факторов: размер группы: половой состав; возрастной состав; наличие и отсутствие близкой родственной связи между контактирующими особями, тип вольера (открытый уличный или закрытый, т.е. в помещении), площадь вольера. Агрессивность оценивали по частоте инициированных агрессивных контактов.

Результаты показали, что частота агрессивных взаимодействий не связана с количеством особей в группе (корреляция Спирмена $R_s=0.103$, $p>0.05$ для *V. v. variegata* и $R_s=0.074$, $p>0.05$ для *V. v. rubra*). Также не выявлено достоверных различий в частоте агрессивных взаимодействий между родственными и неродственными животными.

При этом статистический анализ показал, что различия по агрессивности между группами разного полового состава являются достоверными (критерий Краскела-Уоллиса, $H=4.3$, $p<0.01$ для *V. v. variegata* и $H=6.5$, $p<0.01$ для *V. v. rubra*). Наименьшая частота агрессивных взаимодействий характерна для однополых самцовых групп и для пар (самец и самка). Максимально высокий уровень агрессивности зафиксирован в смешанных группах с численным преобладанием самок над самцами (0.70 раз/ч для *V. v. variegata* и 0.64 раз/ч для *V. v. rubra*).

Далее изучали частоту агрессии в разных по половому составу группах в зависимости от типа конфликтной ситуации. Для этого проанализировали поведение участников конфликтов в течение нескольких минут до агрессивного взаимодействия и нескольких минут после него и выделили следующие конфликтные ситуации: 1) Агрессия на приближающуюся особь, 2) Агрессия как ответ на попытку взаимодействия, 3) Агрессия как препятствие доступу (*к пищевым ресурсам; *к месту, *к другой особи), 4) Вмешательство в чужой конфликт. Во всех группах самой распространенной была агрессия как препятствие доступу к пищевым ресурсам (от 63.5% случаев в группах из одних самок до 89.5% случаев в парах). Доля случаев агрессии на приближающуюся особь была выше в смешанных группах и группах из одних самок, чем в парах и самцовых группах.

В группах, состоящих из самцов и самок, анализировали агрессивные взаимодействия в зависимости от полового состава конфликтных пар. Выявлено, что у обоих представителей преобладали агрессивные взаимодействия в конфликтных парах, где агрессором и жертвой были самки. Самыми редкими из всех агрессивных взаимодействий оказались случаи, когда агрессором выступал самец, а жертвой – самка.

Далее проанализировали частоту инициируемой агрессии в связи с возрастом животных (самцов и самок анализировали отдельно). Для самок выявлено наличие

умеренной положительной корреляции (корреляция Спирмена $R_s=0.48$, $p=0.01$ для *V. v. variegata* и $R_s=0.54$, $p=0.01$ для *V. v. rubra*), т.е. инициаторами агрессии чаще выступали более старшие особи.

Также проанализировали влияние факторов, связанных с условиями содержания. провели сравнительный анализ частоты агрессивных взаимодействий для животных, которые содержались в вольерах, состоящих из закрытой части (в помещении) и открытой (уличной), и имели возможность беспрепятственно перемещаться между ними. Результаты показали, что большая часть агрессивных взаимодействий происходила в закрытых вольерах (58% случаев для *V. v. variegata* и 54% случаев для *V. v. rubra*), однако различия не достигают статистической значимости (критерий Манна-Уитни, $U=60.2$, $p>0.05$ для *V. v. variegata* и $U=54.6$, $p>0.05$ для *V. v. rubra*).

Анализ частоты агрессии в разных по площади вольерах при содержании животных парами (самец и самка) и самцовыми группами показал отсутствие связи между этими показателями (частота агрессии и площадь вольера). В то время как в смешанных группах (несколько самцов и самок) между площадью вольера и частотой агрессии, инициируемой животными, существует умеренная обратная связь.

Аффилятивное поведение (на примере аллогруминга)

Анализовалась частота инициируемых и полученных чисток с учетом следующих факторов: половой состав групп, возраст и инициатора и реципиента; близкая родственная связь; иерархический статус, для этого предварительно была составлена этограмма элементов и комплексов элементов социального поведения лемуров вари, связанных с демонстрацией доминирования/подчинения. Проверяли гипотезу о том, что, чем выше иерархический статус особи, тем больше чисток она будет получать от других членов группы. Сравнили частоту аллогруминга в группах с разным половым составом (однополые группы, смешанные из самцов и самок, пары).

Результаты показали, что и у черно-белых и у красных вари, доминирующая особь не имеет преимуществ в получении груминга. Но показано наличие отрицательной корреляции между возрастом и частотой инициируемых взаимных чисток: молодые особи чаще выступали инициаторами аллогруминга, в то время как самые старшие члены группы демонстрировали наименьшую активность (корреляция Спирмена $R_s= -0,71$, $p=0,05$ для черно-белых вари и $R_s= -0,68$, $p=0,01$ для красных вари). В то же время между возрастом реципиента и количеством получаемых чисток корреляционной связи не выявлено, таким образом, даже самые старые и малоактивные особи, сами почти никогда не выступающие инициаторами аллогруминга, могли быть объектами аллогруминга.

Анализ аллогруминга между неродственными и родственными животными выявил, что и у черно-белых и у красных вари, аллогруминг достоверно чаще встречается между сибсами и в парах «мать-сын», чем между неродственными животными.

Сравнительный анализ частоты взаимных чисток в группах с разным половым составом, который показал наличие значимых различий (критерий Краскела-Уолиса $H=4$, $p<0,01$ для *V. v. variegata* и $H= 5,5$, $p<0,01$ для *V. v. rubra*). В смешанных группах с преобладанием самцов и в парах (самец и самка) частота этих взаимодействий была максимально высокой, в то время как минимальные показатели зафиксированы в однополых группах.

Попарный анализ распределения аллогруминга с учетом пола контактирующих животных показал, что у обоих подвидов преобладал аллогруминг в диадах «самка-самец» (52% случаев для черно-белых и 51% - для красных вари), а между самками встречался в два раза реже.

Маркировочное поведение

Мы понимаем под маркировочным поведением такое поведение, при котором животное оставляет запаховые метки, содержащие информацию о ее отправителе [4]. У обоих полов *Varecia v. variegata* и *Varecia v. rubra* метки наносятся аногенитальными железами, а у самцов кроме этого секретом желез, расположенных в области груди и подбородка. Оценивали влияние на частоту маркировочного поведения животных следующих факторов: размер группы, возраст, агрессивность особей (оценивали по частоте), половой состав групп, площадь и тип вольера.

Результаты показали, что частота нанесения меток не связана с количеством особей в группе. Анализ возраста животных и частоты нанесения меток показал наличие обратной корреляционной связи для самцов ($R_s = -0.42$, $p = 0.01$ для *V. v. variegata* и $R_s = -0.52$, $p = 0.01$ для *V. v. rubra*), т.е. максимальную активность в маркировочном поведении демонстрируют молодые самцы, с возрастом частота нанесения меток снижается. У самок частота нанесения меток не связана с возрастом.

Анализ частоты нанесения меток и частоты агрессивных актов, инициируемых этими особями, показал наличие умеренной прямой связи для самок ($R_s = 0.35$, $p = 0.01$ для *V. v. variegata* и $R_s = 0.41$, $p = 0.01$ для *V. v. rubra*). У самцов связь между этими показателями не достоверна.

В группах с разным половым составом (группы из самцов, группы из самок, смешанные группы) частота нанесения меток колебалась от 0.01 до 0.28 р/час. При этом у самцов не выявлено значимых различий в частоте нанесения меток в зависимости от полового состава групп, для самок же различия достоверны. В смешанных группах с преобладанием самок и группах только из самок средняя частота нанесения меток самками была выше, чем в группах иного состава. Обращает на себя также тот факт, что у самок из пар (самец и самка) маркировочная активность отсутствовала или наблюдались ее единичные случаи.

Частота нанесения меток не связана с типом вольера и с площадью, приходящейся на одного животного ни для самок, ни для самцов обоих подвидов.

Далее для самцов проанализировали соотношение количества меток, нанесенных железами, расположенных на разных участках тела, при этом учитывали половой состав группы – только самцы или смешанная группа из самцов и самок. В первом случае метки наносились преимущественно секретом грудных желез, в то время как самцы из смешанных групп наносили метки преимущественно секретом аногенитальных желез.

У двух самцов из разных групп зарегистрированы единичные случаи ($n=8$) нанесения меток секретом грудной железы на других самцов *V. v. rubra*. Со стороны реципиента в 75% случаев в ответ следовала разной степени агрессия.

Бюджеты времени

Исследование бюджетов времени лемуринов осуществлялось методом временных срезов с интервалом 5 мин, при этом отмечалась форма поведения каждого животного.

Наибольшую часть бюджета времени у обоих представителей составляло неактивное состояние (в среднем 54-57%), что можно считать нормальным, т.к. в природе, согласно ряду исследователей [5,6], неактивное состояние также составляло преимущественную часть бюджета времени.

На втором месте – перемещения, на их долю приходилось в среднем 20%, в то время как в природе доля перемещений составляла до 25,5% [6], что, видимо, связано с поисками пищи до 22% [7].

Наименьшую долю в бюджете времени у обоих представителей составляло манипулирование непищевыми объектами (2-3%) и маркировочная активность (не более 1%). В литературе не удалось найти аналогичных сведений для сравнения

Доля времени, приходящаяся на пищевое поведение, в нашем исследовании составляла в среднем 4,3-5,2%, что меньше, чем в природе – 14-30%. Доля социальных взаимодействий составляла в среднем от 5 до 7%, что примерно соответствует результатам исследований бюджетов времени лемуров в природе – 1-8%, указанным в литературе [5,6].

Сравнительный анализ бюджетов показал, что самки обоих подвидов в неактивном состоянии находятся меньше чем самцы, но больше перемещаются и контактируют с другими членами группы.

Анализ бюджетов времени групп, состоящих из разного числа особей, показал отсутствие значимых различий по всем формам поведения.

Корреляционный анализ в зависимости от площади вольера, приходящейся на одну особь, выявил наличие только одной достоверной связи – слабой обратной с автогрумингом ($R_s = -0.23$, $p > 0.05$). Таким образом, чем меньше площадь в расчете на одно животное, тем выше доля чисток, направленных на себя.

Выводы

1) На частоту агрессивных взаимодействий не оказывает влияния количество особей в группе (размер группы), родство агрессора и жертвы и тип вольера. Оказывает влияние возраст животных, половой состав групп; площадь вольера значима для групп, состоящих из самцов и самок.

2) На характер распределения аллогруминга влияет возраст животных, родство, пол взаимодействующих особей при этом самки чаще являлись реципиентами таких взаимодействий, чем самцы.

3) Частота нанесения меток у обоих представителей не связана с количеством особей в группе, типом вольера и его площадью. У самцов маркировочная активность отрицательно коррелирует с возрастом, а у самок с агрессивностью. У самок маркировочная активность различается в зависимости от полового состава группы. Самцы большую часть меток наносили секретом грудных желез.

4) В целом бюджеты времени лемуров соответствуют литературным данным для животных в естественных условиях, за исключением пищевого поведения. Самки по сравнению с самцами больше перемещаются и контактируют с другими членами группы. На бюджеты времени не влияет количество особей в группе.

Библиографический список

1. Porton I. International Studbook for the Ruffed Lemur (*Varecia variegata variegata* and *Varecia variegata rubra*). Saint-Louis, Missouri: Saint Louis Zoo. – 2000. – 392 p

2. Schwitzer Ch. Seit 20 Jahren Wappentier – Varis (*Varecia variegata*) im Kolner Zoo // Zeitschrift des Kolner Zoo. – 2003. – № 46. – P. 91–102.

3. White F.J., Burton A.S. Social organization of freeranging ruffed lemurs, *Varecia variegata variegata*: mother-adult daughter relationship // American Journal of Primatology. – 1992. – V. 28. – № 4. – P. 281–287.

4. Рожнов В.В. 2011. Опосредованная хемокоммуникация в социальном поведении млекопитающих. М.: Т-во науч. изд. КМК. – 288 с.

5. Hunter J. Sex differences in vertical ranging of black and white ruffed lemurs (*Varecia variegata*) in Ranomafana National Park, Madagascar // Abstracts of Presentations Twenty-fifth Annual Meeting The American Society of Primatologists. – 1–4 June 2002. – P.30.

6. Vasey N. Activity budgets and activity rhythms in red ruffed lemurs (*Varecia rubra*) on the Masoala Peninsula, Madagascar: seasonality and reproductive energetic // *American Journal of Primatology*. – 2005. – V. 66. – № 1. – P. 23–44.

7. Ursich E., Pier G. Captive bred lemur behaviour and endocrinology // *Annual veterinarian of Parma Univ.* – 2004. – V. 24. – P. 193–202.

РОЛЬ ПАСКВАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ НА ПОЧВЕННО-РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПОКРОВ В ПОПУЛЯЦИОННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АДОНИСА ВОЛЖСКОГО (САМАРСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Чернышова И.Е., Сарейкина А.В.

ФГБОУ ВО Самарский государственный социально-педагогический университет,
г. Самара, Россия.

Ключевые слова: *Adonis volgensis*, ценопопуляция, выпас, онтогенетическая структура, Самарская область

В степной и лесостепной зонах европейской части России, в том числе на территории Самарской области, хозяйственное освоение земель имеет длительную историю, а также характеризуется высокой интенсивностью. Среди основных факторов, влияющих на почвенно-растительный покров и характерные для него виды растений, весомое воздействие оказывает выпас крупного рогатого скота [1-8]. Часто на степных и луговых участках именно выпас, а точнее нерегулируемый перевыпас, становится лимитирующим фактором, оказывающим губительное действие на почвенно-растительный покров в целом и в популяции редких и уязвимых растений, произрастающих в конкретных фитоценозах.

Нами предпринята попытка изучить современное состояние ценопопуляций *Adonis volgensis* Steven ex DC. [*Adonanthe volgensis* (Steven ex DC.) Chrtek et Slavíková, *Chrysocyathus volgensis* (Steven ex DC.) Holub], испытывающих воздействие выпаса крупного рогатого скота, на сохранившихся степных участках южной части Самарской области.

В Самарской области адонису волжскому обычно свойственны ценопопуляции нормального типа. Они могут быть как полночленными, так и неполночленными [3, 7, 8]. Для вида свойственна разнообразная популяционная организация, проявляющаяся в динамичности пространственно-онтогенетической структуры и достаточно высоком разнообразии онтогенетических спектров, отличных от базового (характерного) спектра.

В ходе работ использовались популяционно-онтогенетические методики [9-11]. Определены онтогенетические состояния для особей в 25 ценопопуляциях, после чего осуществлено сравнение выявленных онтогенетических спектров ценопопуляций, зарегистрированных в фитоценозах, подверженных выпасу различной степени (или без выпаса). Все обследованные ценопопуляции адониса объединены в 4 группы по степени воздействия – сильный (перевыпас), средний, низкий уровень, отсутствие выпаса.

Выпас скота играет неоспоримую и важную роль в формировании и сохранении степных сообществ. Однако степень выпаса может повлиять на популяционную организацию конкретных видов. На рисунке приведены усредненные онтогенетические спектры ценопопуляций *Adonis volgensis*, условия местообитаний которых отличны по степени выпаса.

Обычно особи *Adonis volgensis* практически не поедаются скотом. Также сравнительно высокий уровень обводненности клеток (растение имеет мезофитные

характеристики) обуславливает выживаемость особей при степных пожарах (невысокой интенсивности). Более чувствительным воздействием для роста и развития отдельных экземпляров и их популяций оказывает вытаптывание и уплотнение почвы при выпасе и прогоне скота.

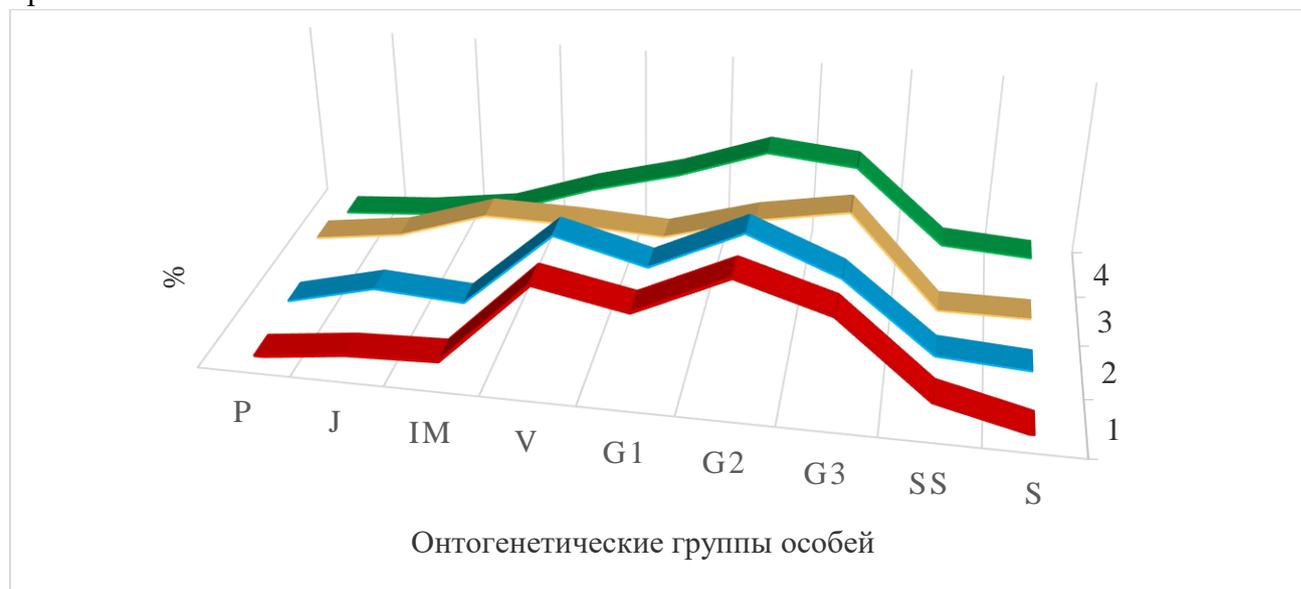


Рис. Распределение онтогенетических групп особей в популяциях:

1 – перевыпас, 2 – средний уровень, 3 – низкий уровень, 4 – отсутствие выпаса; р – проростки, j – ювенильная; im – имматурная; v – виргинильная; g1 – молодая генеративная; g2 – зрелая генеративная; g3 – старая генеративная; ss – субсенильная; s – сенильная группы особей

Онтонетический состав ценопопуляций в указанных группах представлен в таблице.

Таблица

Онтонетический состав ценопопуляций

Онтонетическая группа	Уровень выпаса			
	перевыпас	средний уровень	низкий уровень	отсутствие выпаса
p	0	1,2	5,6	1,7
j	2,4	6,1	8,2	3,1
im	3,1	4,8	14,5	5,9
v	22,2	22,1	14,2	12,6
g1	18,2	16,9	13,2	17,8
g2	27,6	26,3	18,9	24,7
g3	21,5	18,3	22,4	22,9
ss	5	2,8	1,6	6,3
s	0	1,5	1,6	5

Ядро всех 4 групп ценопопуляций представлено генеративными особями (при перевыпасе 67,3%, при среднем уровне 61,5%, при низком 54,3%, в отсутствии выпаса 65,4%). Практически во всех случаях преобладает фракция зрелых генеративных особей, а онтогенетические спектры центрированные, и только при низком выпасе онтогенетический спектр правосторонний – с преобладанием старых генеративных растений.

Прегенеративная группа представлена следующим числом особей – при перевыпасе 27,7%, при среднем уровне 34,2%, при низком 42,5%, в отсутствии выпаса 23,3%. Среди прегенеративных особей наиболее значимой в составе популяций являются виргинильные (примерно 12-22%). При низком уровне выпаса существенен вклад имматурных особей (14,5%), которые в данном случае даже превышают по числу виргинильные. Видимо низкий (эпизодический и незначительный) выпас не мешает развитию молодых особей, имеющих низкие жизненные показатели.

Сенильная группа особей всегда малочисленна, но при отсутствии выпаса достигает 11,3%, что в 2-3 раза выше, чем в других ценопопуляциях. Постгенеративные растения также подвержены элиминации при вытаптывании, с чем связано их накопление в отсутствии данного экологического фактора.

При среднем и низком уровне выпаса более эффективно происходит появление молодых особей в ценопопуляциях, что обеспечивает их лучшее возобновление и достаточную степень устойчивости. При перевыпасе молодые особи чаще погибают при вытаптывании, а прорастание семян затрудняется при уплотнении поверхности почвы. Полное отсутствие выпаса обуславливает значительное развитие дернины степных злаков и постепенное накопление степного войлока, что также сказывается на эффективности возобновления популяций и пополнении их молодыми растениями.

Численность и плотность особей имеют минимальные значения при высокой и средней степени выпаса на обследованных участках.

Выпас скота играет весомую роль в популяционной организации адониса волжского. Структурные особенности ценопопуляций позволяют сделать заключение, что на участках с произрастанием *Adonis volgensis* необходима регламентации выпаса в целях сохранения вида в регионе. Высокий и средний уровень выпаса нежелательны при осуществлении охранных мероприятий вида.

Библиографический список

1. Абрамова Л.М., Андреева И.З., Ильина В.Н. Особенности организации ценопопуляций *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. на особо охраняемых природных территориях Среднего Поволжья и Южного Урала // Самарский научный вестник. – 2018. – Т. 7, № 3 (24). – С. 13-19.
2. Абрамова Л.М., Ильина В.Н., Мустафина А.Н., Каримова О.А. Особенности организации популяций редкого вида *Cephalaria uralensis* (Murr.) Schrad. ex Roem. et Schult (Dipsacaceae) в Заволжье и Предуралье // Поволжский экологический журнал. – 2018. – № 1. – С. 3-15. DOI: 10.18500/1684-7318-2018-1-3-15
3. Ильина В.Н. Жизненность ценопопуляций адониса волжского в Заволжье // Экологические проблемы бассейнов крупных рек - 4: Тез. докл. международ. конф. / Отв. ред. Г.С.Розенберг и С.В.Саксонов (электронный ресурс). – Тольятти: ИЭВБ РАН, 2008. – С. 65.
4. Ильина В.Н. Повторное отрастание копеечников при выпасе и палах // Теоретические проблемы экологии и эволюции (Четвертые Любищевские чтения). – Тольятти: ИЭВБ РАН, 2005. – С. 95-98.
5. Ильина В.Н. Влияние пасквальной и пирогенной нагрузок на структуру популяций копеечников в бассейне Средней Волги // Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии. Материалы Всеросс. науч. конф. с международ. участием, посв. памяти выдающегося ученого Л.В. Бардунова. – Иркутск: Изд-во Ин-та географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2010. – С. 488-490.
6. Ильина В.Н. Пирогенное воздействие на растительный покров // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2011. – Т. 20, № 2. С. 4-30.

7. Ильина В.Н. Эколого-биологические особенности некоторых редких видов растений степной флоры при выпасе и палах // Ботанический вестник Северного Кавказа. – 2017. – № 2. – С. 12-22.

8. Ильина В.Н., Саксонов С.В. Некоторые итоги изучения ценопопуляций адонисов весеннего и волжского (*Adonis vernalis* L. и *A. wolgensis* Stev.) в бассейне Средней Волги // Бюл. Главного ботанического сада. – 2010. – Вып. 196. – С. 107-116.

9. Османова Г.О., Животовский Л.А. Онтогенетический спектр как индикатор состояния ценопопуляций растений // Известия РАН. Серия биологическая. – 2020. – № 2. – С. 144–152.

10. Работнов Т.А. Жизненный цикл многолетних травянистых растений в луговых ценозах // Труды БИН АН СССР. Сер. 3. Геоботаника. – М.: АН СССР, 1950. Вып. 6. – С. 7-204.

11. Уранов А.А. Возрастной спектр фитоценопопуляций как функция времени и энергетических волновых процессов // Биол. науки. – 1975. – № 2. – С. 7-34.

ПОЛИМОРФИЗМ ISSR-PCR МАРКЕРОВ ПЯТИ ПОПУЛЯЦИЙ ЗАПАДНОЙ РАСЫ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) В ПЕРМСКОМ КРАЕ

Чертов Н.В., Нечаева Ю.И., Сбоева Я.В., Малышкина Е.Е., Пыстогова Н.А.
ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет»,
Пермь, РФ

Научный руководитель: д.б.н., профессор Боронникова С.В.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, полиморфизм ДНК, ISSR-PCR маркеры, *Larix sibirica* Ledeb.

Леса являются самым действенным стабилизатором биосферы, главным условием ее существования и устойчивости. Для разработки стратегии сохранения и рационального использования лесных ресурсов, необходимы знания о генетической структуре популяций основных лесобразующих видов растений, уровне их генетической изменчивости и характере её распределения в пределах ареала видов [1].

Объектами исследований являлись пять популяций *L. sibirica* из пяти лесничеств Пермского края: Чердынского (Che), Красновишерского (Krv), Гаинского (Gai), Добрянского (Pol) и Осинского (Osa).

Выделяли ДНК из древесины по методике Кота-Санчеса с модификациями [2]. Для молекулярно-генетического анализа *L. sibirica* использовался ISSR-метод (Inter Simple Sequence Repeats) или межмикросателлитный анализ полиморфизма ДНК. Анализ проводили по стандартной методике [3]. Для описания генетического разнообразия популяций *L. sibirica* были использованы следующие показатели: доля полиморфных локусов (P_{95}), эффективное (n_e) и абсолютное число аллелей (n_a), ожидаемая гетерозиготность (He) и число редких маркеров (R) [4].

Было выявлено 106 ISSR-PCR маркеров, из которых 102 оказались полиморфными ($P_{95}=0,962$). Изученные популяции отличались друг от друга параметрами генетического разнообразия (табл.).

Доля полиморфных локусов наибольшая в популяции Che ($P_{95} = 0,870$), а наименьшая – в Pol ($P_{95} = 0,792$). Ожидаемая гетерозиготность (He) на общую выборку *L. sibirica* составила 0,156. Данный показатель максимальный в популяции Gai ($He = 0,211$), а

минимальный – в Osa ($H_e = 0,131$ Абсолютное и эффективное числа аллелей выше в популяции Gai ($n_a = 1,283$; $n_e = 1,374$), а ниже первый показатель (n_a) – в Pol ($n_a = 0,887$), а также второй показатель (n_e) в Osa ($n_e = 1,214$). Достоверных различий, по критерию Фишера, между наибольшими и наименьшими значениями изученных параметров не установлено. В результате молекулярно-генетического анализа установлены 31 уникальный ISSR-PCR маркер, наибольшее их число оказалось в популяции Krv ($R = 13$), а наименьшее в Pol ($R = 1$).

Таблица

Генетическое разнообразие пяти популяций *L. sibirica*

Популяции	P_{95}	H_e	n_a	n_e	R
Che	0,870	0,137	0,953	1,231	4
Krv	0,845	0,166	1,217	1,276	13
Gai	0,830	0,211	1,283	1,374	11
Pol	0,792	0,134	0,887	1,225	1
Osa	0,807	0,131	0,972	1,214	2
На общую выборку	0,962	0,156	1,062	1,264	31

Примечание: P_{95} – доля полиморфных локусов; H_e – ожидаемая гетерозиготность; n_a – абсолютное число аллелей на локус; n_e – эффективное число аллелей на локус; R – число редких маркеров

Таким образом, наибольшим генетическим разнообразием среди изученных пяти популяций *Larix sibirica* Ledeb. в Пермском крае характеризуется популяция Gai ($P_{95} = 0,830$, $H_e = 0,211$, $n_a = 1,283$, $n_e = 1,374$, $R = 11$), а наименьшим Pol ($P_{95} = 0,792$, $H_e = 0,134$, $n_a = 0,887$, $n_e = 1,225$, $R = 1$). Выявлены уникальные ISSR-PCR маркеры, которые можно рекомендовать для молекулярно-генетической идентификации популяций этого вида в Пермском крае.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/174.3 от 31.01.2019.

Библиографический список

1. Ефремов С.П. Биоразнообразие лиственниц Азиатской России / отв. ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин; Рос. академ. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т леса им. В.Н. Сукачева. – Новосибирск: Гео, 2010. – 159 с.
2. Cota-Sanchez J. H. Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue / J.H. Cota-Sanchez, K. Remarchyk, K. Ubayasena // Plant Molecular Biology Reporter. – 2006. – V.24. – P.161-167.
3. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – 1994. – Vol. 20. – P. 176-183.
4. Nei, M. Molecular Evolutionary Genetics / M. Nei. – New York: Columbia University Press, 1987. – 512 p.
5. Васильева Ю.С. Оценка состояния генофонда западной расы лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) Урала на основании полиморфизма микросателлитных

маркеров / Ю.С. Васильева, Я.В. Сбоева, Н.В. Чертов, А.А. Жуланов // Бюллетень науки и практики. – 2019. – Т.5. – № 12. – С. 98-110.

б. Чертов Н.В. Анализ полиморфизма ДНК западной расы лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на Урале с использованием ISSR-метода / Н.В. Чертов, Ю.С. Васильева, Я.В. Пришневская, А.А. Жуланов // Симбиоз-Россия 2019: Материалы XI Всерос. конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием. Пермь, 2019. С. 159-160.

БАКТЕРИИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА, ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г.

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

Ключевые слова: микробиом, содовое шламоохранилище, алкалофильные бактерии, алкалотолерантные бактерии, гидролитическая активность

Микроорганизмы широко распространены в природе и являются необходимыми компонентами всех известных экосистем на Земле. Одной из характерных особенностей микроорганизмов является то, что некоторые из них эволюционировали, чтобы процветать в «экстремальных» условиях, которые слишком суровы для других организмов. Экстремальные значения температуры, рН, окислительно-восстановительного потенциала, солености, дефицит воды, а также различные комбинации этих факторов, характерны для многих из разнообразных наземных и водных сред обитания, которые заселяются только микроорганизмами [1].

Содовые озера являются экстремальными средами с высокими значениями рН и высокой степенью минерализации и привлекают внимание исследователей различных направлений науки, в том числе экологии, лимнологии, химии и микробиологии. Данные природные системы являются удобной моделью для изучения алкалофильных бактерий [2 – 4]. Это связано с выяснением роли микроорганизмов в функционировании экстремальных мест обитания, обнаружением новых видов галофильных и алкалофильных представителей микробного сообщества, а также с возможностью использования ферментов и других метаболитов этих микроорганизмов в различных биотехнологических целях [5 – 10].

Щелочные высокоминерализованные водные системы помимо естественного происхождения могут быть и антропогенными. Это шламонакопители, места захоронения отходов, щелочные сточные воды. Работы, посвященные изучению микробиома таких искусственных щелочных биоценозов, немногочисленны [10].

Известно, что микробиом как естественных, так и техногенных сред, определяется их составом и физико-химическими условиями и, таким образом, может быть индикатором состояния той или иной среды. С другой стороны, микроорганизмы являются одним из важнейших факторов ремедиации сред, нормализации их химического состава и восстановления экосистем. В связи с этим исследование микробиоценозов необходимо для адекватного понимания экологических процессов, происходящих в техногенных образованиях. Ранее изменение микробного сообщества при естественной рекультивации территории техногенного содового озера не изучалось. Наибольший интерес в таких экосистемах представляют микроорганизмы-гидролитики, как с точки зрения изучения взаимосвязей их филогенетического разнообразия с восстановлением почвенного покрова,

так и в качестве источника ферментов для биотехнологии и других сфер производства [2, 10 – 12].

Целью данной работы является исследование изменения микроценоза содового шламохранилища в процессе естественного восстановления почвенного и растительного покрова после его осушения, а также изучение гидролитической активности бактерий, изолированных из шламонакопителя Березниковского содового завода (Пермский край).

АО «Березниковский содовый завод» является одним из крупнейших российских производителей кальцинированной соды, которую получают из хлорида натрия по методу Сольве. Твердые отходы и промышленные сточные воды технологических процессов поступают в шламовый коллектор и в виде пульпы подаются в шламонакопитель.

Отходы Березниковского содового завода складированы в действующей и старой картах шламонакопителя, которые расположены на северо-западной окраине г. Березники Пермского края. Для исследований микрофлоры в действующем шламонакопителе были взяты пробы воды (ШВ), донных отложений (ШО), техногенного поверхностного образования в прибрежной зоне (ШТПО) и техногенного поверхностного образования с ризосферой растений (ШР). В почвоподобных образованиях осушенного содового озера пробы отбирались с поверхности (ССОП), а также на глубине 5 см (ССО5) и 10 см (ССО10). В пробах было определено содержание катионов и анионов, pH и общая минерализация. Филогенетическое разнообразие микробиома было изучено методом метагеномного секвенирования, чистые культуры гидролитических бактерий были выделены на селективных средах с различными субстратами (эфирами жирных кислот, крахмалом, целлюлозой, протеином) и идентифицированы методом секвенирования гена 16S рРНК. В работе также оценивалась активность таких гидролаз как липаза, амилаза, целлюлаза и протеаза. Данные ферменты катализируют реакции гидролиза сложных органических соединений до более простых, доступных для ассимиляции клеткой. Гидролитические ферменты играют важную роль в питании микроорганизмов, а также используются для широкого спектра биотехнологических и промышленных целей.

Исследуемые образцы характеризуются высокими значениями pH. Так, в образцах из действующего шламохранилища pH воды составляет 11–12.6, отложений соды – 11. В пробах грунта старой карты осушенного шламонакопителя кислотность варьировала в пределах 8–8.5, а pH техногенных поверхностных образований прибрежной части действующего шламохранилища составлял 7.5.

При изучении элементного состава образцов установлено, что доминирующим элементом является кальций. Высокое содержание этого элемента отмечено в образцах действующей и старой карт шламонакопителя. Концентрация кальция в кислоторастворимых и ацетатно-аммонийных фракциях достигала 470 г/кг грунта. Наименьшее количество кальция определили в образцах техногенных поверхностных образований прибрежной зоны действующего шламонакопителя и в воде, тогда как в осадке оно было максимально. Установлено, что в образцах грунта действующего шламохранилища содержание Na было значительно меньше, чем в почвенном покрове осушенной территории старого содового озера, а в водных образцах концентрация натрия была максимальна и достигала 6 г/кг. Следует отметить, что с увеличением глубины отбора проб возрастало количество магния (13–17.6 г/кг). Помимо этого, в образцах действующего шламохранилища содержание двухвалентных металлов было значительно меньше, чем в почвенном покрове старой карты осушенного шламонакопителя. Возрастание содержания металлов в грунте восстанавливаемых территорий содового шламонакопителя по сравнению с действующим шламохранилищем можно объяснить концентрированием солей при испарении воды.

В составе образцов содержится значительное количество ионов: карбонатов, гидрокарбонатов, сульфатов, хлоридов и нитратов. Образцы из действующего шламонакопителя и с поверхности осушенного содового озера характеризовались доминированием хлорид-ионов (табл. 1). Суммарное содержание хлорид-ионов в старом содовом озере и шламохранилище составляло 9.3 и 74.7 г/кг соответственно. Установлено, что содержание карбонатов / гидрокарбонатов возрастало с увеличением глубины отбора проб, суммарное количество которых составило 0.1 / 5.8 г/кг – в старой карте и 1.6 / 3.3 г/кг в новой карте шламохранилища соответственно. В осадке шламохранилища отмечается также значительное содержание аниона SO_4^{2-} – 3.8 г/кг. Снижение концентрации карбонатов, сульфатов и хлоридов в образцах осушенной территории старого шламонакопителя по сравнению с осадками действующего шламохранилища связано с вымыванием растворимых ионов за счет инфильтрации атмосферных осадков и отсутствия свежих поступлений с пульпой, а также и с биогенными процессами, способствующими коррекции кислотности. Кроме того, следует отметить значительное снижение концентрации хлорид-ионов в образцах грунта старого содового озера с глубины 5 и 10 см по сравнению с поверхностью.

Таблица 1

Химический состав образцов новой и старой карты шламохранилища АО «Березниковский содовый завод»

Содержание, мг/кг	Образец					
	ССОП	ССО5	ССО10	ШТПО	ШО	ШР
Минерализация, водная вытяжка	17212	3834	3160	14095	98233	14273
CO_3^{2-}	<0.6	<0.6	103.4	<0.6	1566.3	<0.6
HCO_3^-	1459.8	2172.6	2187.6	733.0	979.9	1607.4
SO_4^{2-}	150.4	58.9	56.6	612.9	3823.3	175.5
Cl^-	9228.7	54.8	65.5	7874.9	59550.2	7237.9
Ca	305053	305646.7	289734.5	54402.9	269499	2778.9
Na	2346	2980	2851.6	1126.2	914	1455.6
Mg	7846.5	9609.8	10419.19	616.9	259.2	177.1

Метагеномный анализ показал, что в изученных образцах доминируют представители двух филумов: *Proteobacteria* и *Firmicutes* (рис. 1). В образцах действующего шламохранилища, а именно в воде и в техногенных поверхностных образованиях, преобладали представители филума *Firmicutes*, тогда как в осадках соды и в объединенном образце грунта старого осушенного шламонакопителя превалировали протеобактерии. В образце, взятом с глубины 10 см из грунта осушенных территорий, преобладали *Firmicutes* и *Acidobacteria*, а количество протеобактерий и актинобактерий было сопоставимо.

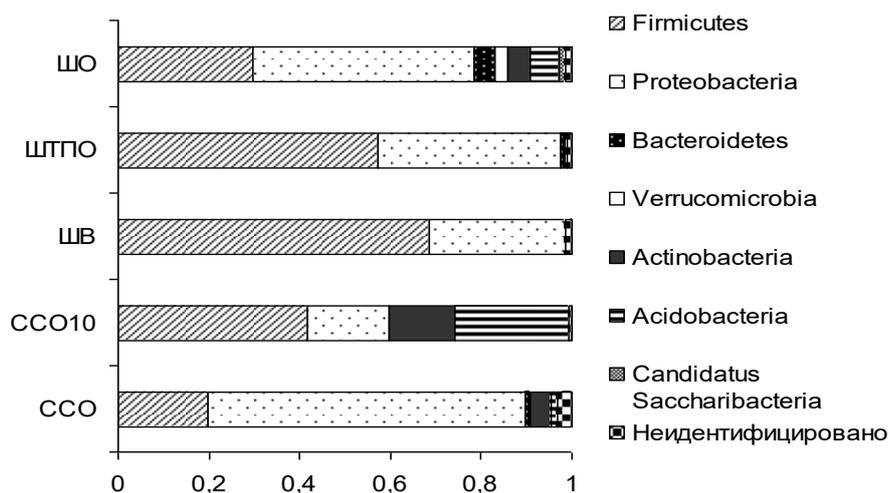


Рисунок 1. Соотношение филумов домена *Bacteria* в образцах старого осушенного и действующего содового шламохранилища

Наиболее выраженное филогенетическое разнообразие микробиоценоза отмечено у образцов грунта старой карты содового шламонакопителя по сравнению с образцами осадков, воды и поверхностных техногенных образований действующего содового шламохранилища. В микрофлоре объединенного образца грунта осушенного содового озера преобладали представители классов *Alphaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* (22–34%), а также *Bacilli* (12%). Классы *Actinobacteria* (37%), *Bacilli* (19,17%) и *Acidobacteria* (12,75%) занимали доминирующее положение в образцах, отобранных на глубине 10 см. В осадках соды и грунте прибрежной части действующего шламонакопителя превалировали классы *Gammaproteobacteria* и *Bacilli*. В воде филогенетическое разнообразие микроорганизмов заметно снижалось, основу микробного сообщества составили три класса: *Bacilli* (57,51), *Gammaproteobacteria* (29,79%) и *Clostridia* (4,55%). На территории действующего содового шламохранилища преобладали представители родов *Staphylococcus* и *Acinetobacter*, а в грунте старого осушенного содового озера на глубине 10 см доминировал род *Cellulomonas* (*Cellulomonas uda*).

Анализ состава образцов показал, что при прекращении эксплуатации земель, занятых содовыми шламохранилищами, происходит их восстановление, а именно: осушение, увеличение концентрации солей на поверхности, вымывание части растворимых ионов и снижение pH до слабощелочных значений, появление растительного покрова и почвообразование. Появление растительности на осушенных территориях соотносится с изменением микробиома: на глубине 10 см снижается доля протеобактерий, но увеличивается доля ацидобактерий и актинобактерий, что может быть связано с приближением pH техногенных поверхностных образований к нейтральным значениям и появлением микроокружения, создаваемого ризосферой растений. Также на глубине 10 см уменьшается разнообразие и изменяется состав семейств домена *Bacteria*: значительно снижается доля семейства *Moraxellaceae* и *Staphylococcaceae*, но при этом появляются представители семейства *Streptococcaceae*, которое становится доминирующим.

При скрининге образцов грунта, осадков и воды действующего и осушенного содового шламохранилища выделены и идентифицированы культуры алкалотолерантных умеренно галофильных бактериальных культур с липолитической, целлюлозолитической, протеолитической и амилолитической активностями.

На среде с селективными субстратами при pH 8 изолированы алкалотолерантные бактерии. Среди штаммов, выделенных из материала старого содового шламонакопителя,

значительную часть составляли протеобактерии. Таксономическим разнообразием характеризовались изоляты, выделенные на среде с крахмалом. Были идентифицированы следующие виды: *Sphingopyxis panaciterrae*, *Ensifer morelensis*, *Pseudomonas peli*, *Microcella putealis*, *Arthrobacter ginsengisoli*, *Bacillus cereus* и *Pedobacter quisquiliarum*. На средах с твином и пептоном доминировали культуры *Ensifer morelensis*, а также виды рода *Pseudoxanthomonas* и представители класса *Bacilli*. Культуры *Lysobacter prati*, *Paenarthrobacter aurescens*, *Metabacillus indicus* выделены на среде с целлюлозой, которая является наиболее сложно метаболизируемым субстратом из используемых.

Из образцов с территории действующего шламохранилища выделялись преимущественно актинобактерий, а именно представители родов *Actinotalea*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Microbacterium*, *Microcella*, *Micrococcus*, *Paenarthrobacter* и *Bacillus*.

Существенных отличий по составу микроорганизмов, высеваемых из материала действующего и осушенного шламонакопителей на богатой среде при pH 11, не было выявлено. Изолированы виды рода *Oerskovia*, а также бациллы, которые не выделялись на средах с более низким pH и являются алкалофилами (*B. aequororis*, *B. halmapalus*, *B. zhangzhouensis*).

В образцах старого осушенного шламонакопителя отмечено высокое содержание микроорганизмов, обладающих амилолитической, целлюлолитической, протеолитической и липолитической активностями, максимальное на глубине около 5 см ($3,31 \times 10^9$ КОЕ/г). Вероятно, что такая локализация бактерий-гидролитиков связана с расположением зоны наибольшего поступления метаболитов с экссудатом корней растений, а также накопления биогенных органических остатков.

В осадке шламохранилища, где pH достигает 11, количество микроорганизмов, утилизирующих крахмал, целлюлозу и пептон было незначительным ($4,4 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$ и $2,63 \times 10^4$ КОЕ/г соответственно). Однако в образцах прибрежной зоны, содержащих ризосферу растений, где pH снижается до 8, количество микроорганизмов, утилизирующих крахмал, полисахариды, твин-80 и пептон, повышалось до $8,4 \times 10^8$ КОЕ/г. Также наблюдалось увеличение количества бактерий, обладающих липолитической активностью (до $5,7 \times 10^9$ КОЕ/г).

Скрининг гидролитической активности бактериальных изолятов из искусственной щелочной среды позволил выявить наиболее перспективные штаммы, обладающие как внеклеточными (выраженными на литр культуральной жидкости), так и связанными с клетками (на миллиграмм сухой биомассы) гидролитическими активностями. Так максимальная активность амилазы отмечена у изолятов, идентифицированных как *Ensifer morelensis*, 30.32 мкмоль/л/мин; *Paenisporasarcina quisquiliarum*, 20.03 мкмоль/л/мин; *Paenarthrobacter nitroquajacolicus* 14.7 мкмоль/л/мин и 8.65 мкмоль/л/мин. Культура *Pseudomonas peli*, характеризовалась высокой активностью липазы в культуральной жидкости и в биомассе 0.83 мкмоль/л/мин и 2.97 мкмоль/л/мин соответственно. Протеолитическая и целлюлолитическая активность отмечена у культур *Arthrobacter halodurans*, *Micrococcus aloeverae* и *Microbacterium pygmaeum*, *Lisobacter soli*, *Bacillus indicus*.

Таким образом, показано, что при восстановлении осушенных территорий старой карты содового шламонакопителя, наблюдаются изменения в составе микробиома как по сравнению с действующим шламохранилищем, так и в зависимости от глубины отбора проб. Наблюдается смена состава микробного сообщества, свидетельствующая как об изменении минерального состава и физико-химических условий местообитания, так и об обогащении среды органическими субстратами, пригодными для питания гетеротрофных микроорганизмов – продуцентов гидролитических ферментов.

Также было показано, что в содовых шламонакопителях развиваются гидролитические бактерии, адаптированные к экстремальным условиям среды. Выделенные изоляты являются материалом для дальнейшей селекции, целью которой будет получение продуцентов активных ферментов, устойчивых в щелочной среде с высокими концентрациями солей. *Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90103.*

Библиографический список

1. Kusum D., Pandey A. Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 100. – P. 2499-2510.
2. Sorokin D.Y., Banciu H.L., Muyzer G. Functional microbiology of soda lakes // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2015. – V. 25. – P. 88-96.
3. Grant W.D., Jones B.E. Bacteria, Archaea and Viruses of Soda Lakes // *Soda Lakes of East Africa* / под ред. M. Schagerl.: Springer, Cham. – 2016. – P. 97-147.
4. Kulkarni S., Dhakar K., Joshi A. Alkaliphiles: Diversity and Bioprospection // *Microbial Diversity in the Genomic Era.* : Elsevier Inc. – 2019. – P. 239-263.
5. Casamayor E.O., Triadó-Margarit X., Castañeda C. Microbial biodiversity in saline shallow lakes of the Monegros Desert, Spain // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2013. – V. 85. – № 3. – P. 503–518.
6. Kumar R.M., Kaur G., Kumar A., Bala M., Singh N.K., Kaur N., Kumar N., Mayilraj S. Taxonomic description and genome sequence of *Bacillus campisalis* sp. nov., a member of the genus *Bacillus* isolated from a solar saltern // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2015. – V. 65. – № 10. – P. 3235-3240.
7. Malekabadi S., Badoei-dalfard A., Karami Z. Biochemical characterization of a novel cold active, halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2017. – V. 109. – № 1. – P. 389-398.
8. Sorokin D.Y., Chernyh N.A. *Desulfonatronospira sulfatiphila* sp. nov., and *Desulfitispora elongata* sp. nov., two novel haloalkaliphilic sulfidogenic bacteria from soda lakes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2017. – V. 67. – № 2. – P. 396-401.
9. Karray F., Abdallah B.M., Kallel N., Hamza M., Fakhfakh M., Sayadi S. Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic Bacteria and Archaea isolated from hypersaline lake // *Mol. Biol. Rep.* – 2018. – V. 45. – № 5. – P. 1297-1309.
10. Kevbrin V.V. Isolation and Cultivation of Alkaliphiles // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2019. – V. 84. – № 4. – P. 127-141.
11. Ibrahim A.S.S., Al-Salamah A.A., Elbadawi Y.B., El-Tayeb M.A., Ibrahim S.S.S. Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes // *Electronic Journal of Biotechnology.* – 2015. – V. 18. – P. 236-243.
12. Sharma K.M., Kumar R., Panwar S., Kumar A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* – 2017. – V. 15. – P. 115-126.

МОДЕЛЬНЫЕ ДОЛГОВРЕМЕННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО БИОДЕСТРУКЦИИ КОРОДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ ИСКУССТВЕННЫМИ СООБЩЕСТВАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Шилова А.В.¹, Максимов А.Ю.^{1,2}, Максимова Ю.Г.^{1,2}, Лопатина А.С.³, Щетко В.А.⁴

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, г. Пермь, Россия

²ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия

³ФГБОУ ВО Пермский национальный исследовательский политехнический университет, г. Пермь, Россия

⁴Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Ключевые слова: бактериальная биодеструкция, биоудобрение, кородревесные отходы, целлюлазы, гидролитическая активность

Древесные материалы являются важнейшим природным возобновляемым сырьём, отходы которого являются полностью биоразлагаемыми. Однако в течение последнего полувека скорость вырубки лесов и использования древесины столь высока, что кородревесные отходы накапливаются в количествах, составляющих сотни миллионов тонн и не могут быть утилизированы естественным путём в местах складирования. Они в большом количестве образуются при деревообработке и производстве целлюлозно-бумажной продукции [Гелес, 2007, Monte et al., 2009].

Кородревесные отходы (КДО) в большинстве зарубежных стран полностью утилизируются, главным образом, как топливо и как целлюлозное сырьё, часто заменяющее кондиционную древесину в производстве мебели, бумаги, строительных и конструкционных материалов. Рациональное использование данного вида отходов способствует снижению объёма вырубок. Однако в России образуется и накапливается огромное количество объектов складирования таких отходов в виде отвалов опила, щепы, короотвалов целлюлозно-бумажных комбинатов, что вызывает серьёзные экологические проблемы в связи с их пожароопасностью [Monte et al., 2009; Крылов, 2010].

Крупнейшими и проблемными объектами на территории Пермского края являются короотвалы Краснокамского ЦБК "Кама" и Пермского ЦБК. Объекты существуют более 70 лет содержат миллионы тонн КДО, в разной степени подвергнутых естественной деградации, вследствие чего их использование в качестве топлива не рационально (по причине низкой теплоотдачи и необходимости сушки перед сжиганием).

Более рациональным применением частично гумифицированных КДО представляется их использование для мульчирования, структурирования почв и удобрения в сельском хозяйстве. Однако внесение больших количеств таких материалов без предварительной ферментации и коррекции состава среды может приводить к снижению плодородия пашни за счет закисления и развития большого количества микромицетов и гнилостных микроорганизмов в результате аэробной биодegradации. Поэтому для использования КДО в сельском хозяйстве необходимо их предварительное компостирование [Варфаломеев, 1998; Федорец, Бахмет, 2008; Тебенькова, Гагарин, 2014].

В качестве организмов, которые активно осуществляют такую ферментацию, могут быть различные дереворазрушающие грибы, макромицеты и микромицеты. В частности, рассматриваются грибы белой гнили - деструкторы древесины [Капич, 2013]. Однако, большой потенциал имеют методы с использованием бактерий и микромицетов – биодеструкторов лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы, а так же их комбинаций [Bayer et al., 2007; Марьиновская, 2006; Hussain et al., 2017; Yang et al., 2017; Максимов и др., 2018].

В настоящей работе проведены модельные долговременные эксперименты по биодеструкции материала КДО выделенными микроорганизмами и искусственными сообществами, а также применению полученных субстанций в качестве органического удобрения. В связи с дефицитом в среде КДО источников фосфора и азота проводили коррекцию среды с помощью моно- и дифосфата калия и аммиачной воды (являющейся отходом полимерного производства).

КДО выделенными микроорганизмами и искусственными сообществами, а также применению полученных субстанций в качестве органического удобрения. Образцы КДО, взятые с поверхности 0-20 см, с глубины 1, 2 и 5 м предварительно прогревали при температуре 105° С в течение 30 минут в автоклаве и инокулировали составленными сообществами микроорганизмов.

Режим температурной обработки был выбран таким образом, чтобы сохранить исходную природу и структуру образцов КДО, но устранить присутствие естественной микрофлоры образцов. В качестве контролей взяты также неавтоклавируемые варианты.

Маркерными показателями биодеструкции были: 1) убыль массы сухого остатка; 2) выделение в среду водозэкстрагируемых фенольных соединений, как результат биодеструкции лигнина и мобилизации низкомолекулярных фенольных компонентов; 3) выделение в среду ацетата, как результат биодеструкции полисахаридов и углеводов.

Проведены эксперименты по биодеструкции КДО бактериальными культурами. Для этого образцы КДО инокулировали культурами и сообществами бактерий Антойл+, *Cellulomonas* sp., *Streptomyces* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Cellulomonas* sp.+*Streptomyces* sp., *Cellulomonas* sp.+ *Streptomyces* sp.+ *L. plantarum*, *Cellulomonas* sp.+*Streptomyces* sp.+Антойл+(таблица 1).

Таблица 1

Бактериальная биодеструкция КДО

Опытный вариант	Контроль (без культуры)	Контроль (без культуры нестерильный)	Антойл+	<i>Streptomyces</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Cellulomonas</i> + <i>Streptomyces</i>	<i>Cellulomonas</i>	+ <i>Cellulomonas</i> <i>Streptomyces</i> + <i>Lactobacillus</i>	+ <i>Cellulomonas</i> <i>Streptomyces</i> + Антойл+
№ варианта	1	2	3	4	5	6	7	9	10
Убыль сухой массы, %	0	2,1± 0,3	3,6± 0,4	7,4± 1,0	9,9± 1,5	5,3± 0,7	7,6± 0,9	8,8± 1,4	9,4± 1,5
Общее содержание водозэкстрагируемых фенольных в-в, мг/л	2,6± 0,2	3,1± 0,6	4,2± 0,9	8,7± 1,4	14,3± 1,5	9,1± 1,1	12,4± 1,7	15,6± 1,6	13,3± 1,5
Общее содержание ацетат-иона, мг/л	0	6,9± 0,8	7,3± 0,3	16,9± 1,9	17,4± 1,5	74,6± 6,2	30,9± 3,3	65,6± 5,8	71,5± 7,0

Микробный препарат Антойл+ является коммерческим препаратом, разработанным в Институте микробиологии НАН Беларуси, представляет собой консорциум бактерий родов *Bacillus* и *Rhodococcus* - деструкторов биополимеров и липидов, предназначенный для интенсификации очистки сельскохозяйственных, пищевых, бытовых, и промышленных сточных вод и отходов.

Активность процессов биодеструкции определяли по убыли сухой массы остатка (%), содержанию водозэкстрагируемых фенольных соединений и ацетат-иона, высвобождаемых при биодеструкции, мг/л.

В серии экспериментов установлено, что при засевной дозе 10^9 , оптимизации элементного состава среды и pH, при использовании искусственного сообщества потеря массы КДО по сухому весу в течение 90 суток составляет от 8 до 27%. При увеличении начальной концентрации КОЕ скорость процесса кратно возрастала. Установлено, что ферментированная таким образом масса КДО при её стабилизации аммиачной водой и фосфатами является эффективным биоудобрением. В результате биодеструкции наблюдается частичное оживление материала КДО. Жидкая фаза представляет собой препарат, эффективно стимулирующий рост рассады и модельных растений овощных культур (перец, томаты, огурцы, салат и др.). Как удобрение, стимулятор роста и субстанция, структурирующая почву, хорошо себя показал твердый ферментированный остаток. При использовании на кислых суглинистых почвах возможно комплексное внесение полученного твердого биоудобрения с известняком или известковой пастой для стабилизации кислотности. На основе модельных экспериментов нами предложена новая технология ферментации, ранее не рассматриваемая в отношении короотвалов ЦБК. Важными элементами новой технологии является создание зоны активной биодеградации КДО с помощью нового вида реактора открытого типа, создающего в определенном радиусе зону, оптимизированную для роста биодеструкторов.

Таким образом, рациональным подходом для переработки растительного сырья представляется ферментация в оптимизированных условиях по содержанию биогенных элементов и микроэлементов с использованием адаптированных искусственных сообществ и получением в результате органических удобрений в жидком и пастообразном виде.

Исследовано влияние полученных продуктов биодеструкции КДО на рост модельных растений (томатов). В качестве модельного объекта для анализа влияния продуктов биологической конверсии КДО на рост растений использовали томаты скороспелого низкоростного сорта «Серебристая ель». Семена томата высаживали в почвогрунт в 12-ти вариантах, представляющий из себя смеси песка или торфо-песчаной смеси с КДО или жидкими или твердыми продуктами в ферментации КДО, а также контрольные варианты.

Эксперименты с использованием продукта переработки КДО в качестве грунта и биоудобрения проводили в специализированных гроу-боксах для культивирования растений в контролируемых условиях (рисунок 1). Все эксперименты выполняли в 3-кратной повторности. Применение полученного биоудобрения оказало значительное влияние на изменение параметров роста томатов, по сравнению с контрольным вариантом.

Показано, что как жидкая фаза полученных продуктов ферментации КДО (рисунок 1, вар. 4), так и твердая фаза продуктов ферментации КДО (рисунок 1, вар. 5,6), существенно стимулируют рост растений.



Рисунок 1. Рост растений томатов в течение 7 суток. Варианты почвогрунта: 1 – ТПС (500 г) + биоудобрение (1) 50 г; 2– торфо-песчаная смесь; 3– ТПС + биоудобрение жидкая фаза (1), 50 г; 4 – ТПС + биоудобрение жидкая фаза (6), 50 г; 5 –Песок + биоудобрение (1) 2:1; 6 – Песок + биоудобрение (1) 4:1

Установлено, что введение в биопрепарат (продукты ферментации) дополнительных культур бактерий - биодеструкторов, обладает как гидролитическим действием на элементы КДО, так и ростстимулирующим действием на модельные растения (рисунок 2). В результате бактериальной обработки наблюдалось увеличение длины корня и побега на 7-ой день роста томата по сравнению с контролем (вариант полученного биоудобрения без инокуляции культурами стимулирующими рост).

Под воздействием суспензии клеток штамма азотфиксатора и продуцента фитогормона ауксина *Azospirillum* sp. длина корней проростков томата увеличивается в 2.29 раз по сравнению с контрольным вариантом. В то время как штаммы *Pseudomonas putida* (2) и *Azospirillum* sp. (3) менее влияли на длину корней на 7-ой день роста томатов, но способствовали увеличению длины побега относительно контрольного варианта.

Таким образом, установлены технологические параметры микробиологической переработки КДО для получения эффективного биоудобрения, стимулирующего рост и развитие модельных растений. разработан способ получения эффективных форм твердого и жидкого биоудобрения. Рациональным подходом представляется ферментация рассматриваемых материалов с получением органических удобрений в жидком и пастообразном виде. Как жидкая фаза, так и твердый ферментированный остаток показали

хорошие результаты в качестве удобрения, стимулятора роста и субстанции, структурирующей почву.

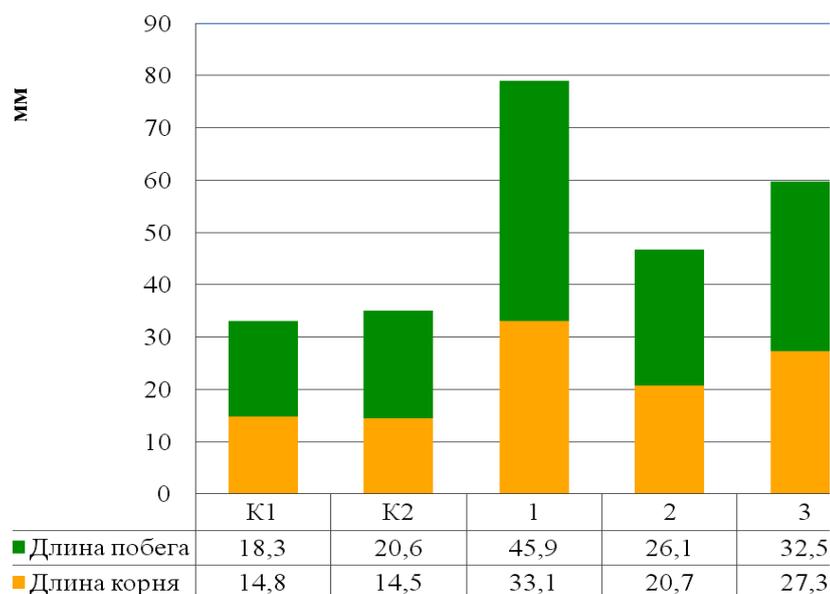


Рисунок 2. Влияние инокуляции жидким биоудобрением на рост модельных растений томатов: K1 – контрольный вариант, торфогрунт; K2 – контрольный вариант, продукт переработки КДО (1); 1 – дополнительное внесение штамма *Azospirillum* sp. 1; 2 – штамма *Pseudomonas putida* 2; 3 – штамма *Azospirillum* sp. 3.

В результате проведенных исследований показано, что искусственные микробные сообщества способны эффективно перерабатывать кородревесные отходы в биологические удобрения, которые могут быть использованы для повышения плодородия почвы. Проведено составление и взаимная адаптация микроорганизмов искусственных микробных сообществ, утилизирующих разные компоненты КДО. Показана их жизнеспособность и возможность совместной ферментации, позволяющая перерабатывать КДО в органические удобрения. Предложенные микробные сообщества и технологические приемы могут быть использованы как на короотвалах Пермского края, так и для решения аналогичных проблем на подобных проблемных объектах Калининградского и Байкальского ЦБК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта МИГ №С-26/796.

Библиографический список

1. Гелес И.С. Древесное сырье-стратегическая основа и резерв цивилизации // Петрозаводск: Карел. научный центр РАН, 2007. – 499 с.
2. Monte M.C., Fuente E., Blanco A., Negro C. Waste management from pulp and paper production in the European Union // Waste Management Res. – 2009. – V.29. – P. 293–308.
3. Крылов В.А. Решение экологических проблем – переработка короотвалов ЦБК и других древесных отходов в твердое биотопливо // Возобновляемая энергетика на Северо-Западе России: Сборник докладов международного конгресса «Дни чистой энергии в Петербурге – 2010» / ред. д.т.н., проф. Елистратова В.В.. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. – 144 с.
4. Варфоломеев, Л.А. Приготовление промышленных компостов на основе твердых отходов деревообработки. – М.: Наука, 1992. – 52с.

5. Федорец Н.Г., Бахмет О.Н. Органические удобрения из отходов деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности // Экология и промышленность России. – 2008. - №4. – С. 13-15.
6. Тебенькова, Д.Н. Гагарин Ю.Н. Всхожесть и биометрические параметры семян, выращенных на субстратах из твердых отходов целлюлозно-бумажной промышленности // Лесоведение. – 2014. – № 6. - С 43-52.
7. Капич, А.Н. Перспективы биоремедиации с использованием дереворазрушающих базидиальных грибов // Экологический вестник. Минск. – 2013. – № 3(25). – С.19-24.
8. Bayer, E.A., Lamed R., Himmel M.E. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management // Curr. opinion in Biotechnol. – 2007. – № 18 (3). – С. 237-245.
9. Марьиновская, Ю.В., Севастьянова Н.Н. Микробиологическая деструкция целлюлозосодержащих отходов // Микробиология. – 2006. – № 3. – С. 75-81.
10. Hussain, A.A., Abdel-Salam M.S., Abo-Ghalia H.H., Hegazy W.K., Hafez S.S. Optimization and molecular identification of novel cellulose degrading bacteria isolated from Egyptian environment // J. Genet. Engineer. Biotechnol. – 2017. – V.15. – P.77-85.
11. Yang, C.-X., Wang T., Gao L.-N., Yin H.-J., Lü X. Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China // Journal of Applied Microbiology. – 2017. – V.123(6). – P.1447-1460.
12. Максимов, А.Ю., Максимова Ю.Г., Шилова А.В., Колесова О.В., Симонетти Дж. Исследование свойств и микробиологического состава кородревесных отходов короотвала г. Краснокамск // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. – 2018. – № 4. – С. 98-112.

МОНИТОРИНГ ЭКТОМИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ БЕРЕЗНЯКА РАЗНОТРАВНОГО В ЮЖНОТАЕЖНЫХ ЛЕСАХ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Шишигин А.С.

*ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия.*

Ключевые слова: эктомикоризные грибы; мониторинг; березняк разнотравный; Пермский край.

Эктомикоризные грибы, вступающие с высшими сосудистыми растениями в консортивные отношения в форме микосимбиотрофизма, распространены в лесных экосистемах и составляют значительную часть от общего числа обитающих в них агарикоидных базидиомицетов [1, 2]. «Плодоношение» эктомикоризных грибов является показателем дополнительного получения углеводов и повышения интенсивности фотосинтеза у древесных растений [2]. Стационарные наблюдения позволяют количественно оценить и выявить структуру грибного компонента. Поэтому, данные исследования очень важны для понимания развития лесных экосистем. В связи с этим, целью нашей работы является мониторинг эктомикоризных грибов березняка разнотравного. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: 1) выявление видового состава эктомикоризных грибов березняка разнотравного; 2) проведение анализа таксономической структуры; 3) определение доминирующих видов грибов по числу базидиом и их биомассе; 4) выявление зависимости «плодоношения» эктомикоризных грибов от количества осадков и температуры воздуха.

Объекты и методы исследования. Микоэкологические наблюдения проводились стационарным методом в 2010–2012 гг. (III — период) на пробной площади, размером 50 × 20 м. в березняке разнотравном, подзоны южной тайги Пермского края, в окрестностях ООПТ «Верхняя Кважва». Для сравнения видового состава и биомассы эктомикоризных агарикоидных базидиомицетов взяты данные мониторинга Л.Г. Переведенцевой [1] за 1975–1977 гг. (I — период), 1994–1996 гг. (II — период). Учет видового разнообразия, числа и биомассы плодовых тел грибов осуществлялся в августе один раз в декаду. В сентябре изучался лишь видовой состав грибов.

Степень сходства биогеоценозов по видовому составу грибов и высших сосудистых растений вычислялась при помощи коэффициента Жаккара [3]:

$$J = \frac{c}{a+b-c} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где J – коэффициент Жаккара; c – число общих видов в двух сравниваемых биоценозах; a , b – число видов грибов в каждом из ценозов.

Доминирующие виды грибов устанавливались по числу базидиом и по их воздушно-сухой биомассе. Для выявления доминантов по биомассе и числу базидиом использовался индекс доминирования [4]:

$$D = \frac{a}{b} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где D – индекс доминирования; a – число базидиом (или биомасса) грибов данного вида; b – число базидиом (или биомасса), собранных на всей учетной площади.

К доминантам были отнесены лишь те виды грибов, которые имеют индекс доминирования равный 5 или более, что составляет 5% или более от общего числа плодовых тел, или их суммарной биомассы за каждый период наблюдений.

Состав эколого-трофических групп грибов определялся по шкале, предложенной А.Е. Коваленко [5]. Список видов грибов составлен по системе, принятой М. Мозером [6], с некоторыми дополнениями [1]. В скобках указаны синонимы видов грибов, соответствующие современной классификации [7]. В работе использовались микроскопы ZEISS Axio Imager A2 и Olympus BX 51.

Влияние климатических показателей на биоту эктомикоризных грибов изучалось с помощью корреляционного анализа. В качестве характеристик микобиоты взяты число и биомасса базидиом эктомикоризных грибов за август. В качестве климатических показателей использованы данные метеостанции г. Добрянка: средняя месячная температура воздуха (°C) и сумма осадков (мм) по месяцам с мая по сентябрь; сумма осадков (мм) по декадам августа; средняя температура воздуха (°C) по декадам августа. Корреляционный анализ осуществлялся с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s). При p -уровне не более 0,05 результат считался статистически значимым [8]. Математическая обработка осуществлялась при помощи программ StatSoft Statistica 10 и Microsoft Office Excel 2016.

За время наблюдений (1975–1977, 1994–1996, 2010–2012 гг.), по данным метеостанции г. Добрянка, погодные условия отличались от средних многолетних характеристик повышенным фоном температур воздуха. Количество осадков варьировало и зачастую отличалось от средних многолетних данных. Самыми неблагоприятными для развития грибов следует считать 1975 и 2011 гг., как наиболее засушливые и 1994 г., отличающийся большим количеством осадков и пониженными температурами воздуха в июне–августе.

Эколого-ценотическая характеристика березняка разнотравного. Исследуемый биогеоценоз занимает равнинное плато на месте вырубленного елового леса. Возраст около 85 лет. Состав древостоя 10Б+Е. Сомкнутость крон 0,5. В подросте преобладает *Picea obovata* Ledeb. и *Abies sibirica* Ledeb. Проективное покрытие травяного яруса 80–90 %. Из

разнотравья доминируют такие растения, как *Aegopodium podagraria* L., *Oxalis acetosella* L., *Dryopteris carthusiana* Vill. Довольно часто встречается: *Asarum europaeum* L., *Athyrium filix-femina* (L.) Roth, *Pulmonaria obscura* Dumort. Подлесок сильно развит, состоит из: *Rubus idaeus* L., *Lonicera xylosteum* L., и *Padus avium* Mill. Моховой покров представлен зелёными мхами, растущими около стволов деревьев. В лесу много валежника. Почва дерново-сильнопodzolistая, супесчаная. В видовом составе высших сосудистых растений, по периодам наблюдений, значительных изменений не происходило: $J_{I-II} = 70$ $J_{II-III} = 64$, $J_{I-III} = 56$ (римскими цифрами обозначены периоды исследований).

Результаты и их обсуждение. Биота агарикоидных базидиомицетов березняка разнотравного довольно разнообразна. В 2010–2012 гг., обнаружено 171 вид агарикоидных базидиомицетов, 81 из которых являются микоризообразователями (19 родов, 8 семейств), что составляет 47,4% (от общего числа видов, отмеченных в период). В изучаемом биогеоценозе эктомикоризные грибы являются преобладающей эколого-трофической группой, что характерно для всей лесной зоны Голарктики [1, 9]. В III период наблюдений впервые в березняке разнотравном обнаружено 20 видов эктомикоризных грибов, из числа которых 3 вида оказались новыми для Пермского края: *Cortinarius atropusillus*, *C. subbalaustinus*, *C. turgidus*.

За все время исследований (1975–1977, 1994–1996, 2010–2012 гг.) выявлено 117 видов и внутривидовых таксонов эктомикоризных агарикоидных базидиомицетов, входящих в состав 20 родов и 8 семейств (таблица).

Таблица

Таксономический состав эктомикоризных грибов березняка разнотравного

Порядок	Семейство (число родов/видов)	Роды (число видов)
Agaricales	Amanitaceae (1/8)	Amanita (8)
	Coprinaceae (1/1)	Coprinus (1)
	Cortinariaceae (3/49)	Cortinarius (30), Hebeloma (4), Inocybe (15)
	Entolomataceae (2/2)	Clitopilus (1), Entoloma (1)
	Tricholomataceae (5/10)	Clitocybe (1), Collybia (2), Laccaria (2), Lepista (2), Tricholoma (3)
Boletales	Boletaceae (5/10)	Boletus (1), Chalciporus (1), Leccinum (4), Suillus (1), Xerocomus (3)
	Paxillaceae (1/1)	Paxillus (1)
Russulales	Russulaceae (2/36)	Lactarius (13), Russula (23)
Всего	8 семейств	20 родов (117 видов)

Суммировав данные третьего периода с результатами предыдущих наблюдений, отметим, что в общем списке видов эктомикоризных грибов ведущее положение занимают сем. *Cortinariaceae* (49 видов), *Russulaceae* (36), *Tricholomataceae* (10) и *Boletaceae* (10), к которым относится 89,7% всех выявленных микоризообразователей. Преобладание данных семейств указывает на бореальный характер исследуемой территории [1, 9]. На протяжении трех периодов наблюдений в березняке разнотравном, происходили некоторые изменения в составе ведущих семейств эктомикоризных грибов (рисунок 1).

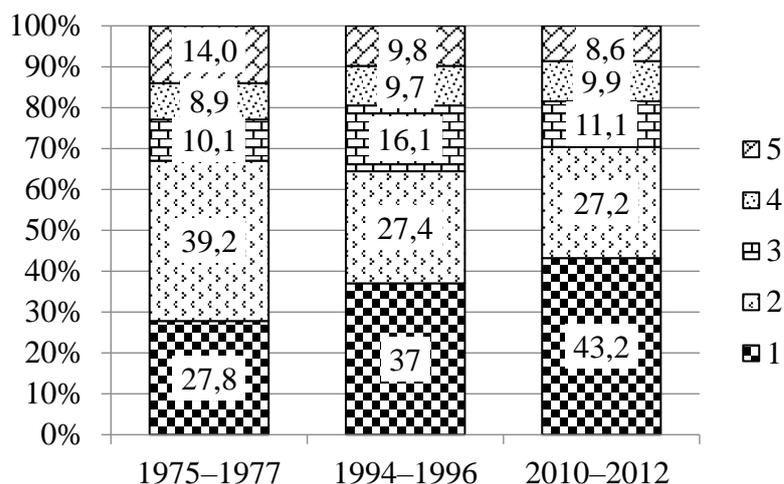


Рисунок 1. Соотношение ведущих семейств эктомикоризных грибов в березняке разнотравном по периодам наблюдений (в процентах от числа видов микоризообразователей за период): 1 – *Cortinariaceae*, 2 – *Russulaceae*, 3 – *Tricholomataceae*, 4 – *Amanitaceae*, 5 – остальные сем-ва

В I период наблюдений, доминирующее положение занимало сем. *Russulaceae* (39,2%), во II и III периоды сем. *Cortinariaceae* (37,0–43,2%). Остальные семейства были представлены в различной степени. Наиболее крупными родами по числу видов эктомикоризных грибов за все время наблюдений являются: *Cortinarius* (30 видов), *Russula* (23), *Inocybe* (15) *Lactarius* (13) и *Amanita* (8), что характерно для лесных ценозов подзоны южной тайги [1, 9].

Микобиота эктомикоризных грибов березняка разнотравного подвергалась некоторым изменениям по периодам наблюдений. Коэффициенты общности (по Жаккару: $J \cdot 100$) между периодами колебались от 43 до 49 ($J_{I-II} = 45$, $J_{II-III} = 43$, $J_{I-III} = 49$). С течением времени происходит сближение видового состава эктомикоризных грибов, что свидетельствует о наличии мицелиального континуума во времени.

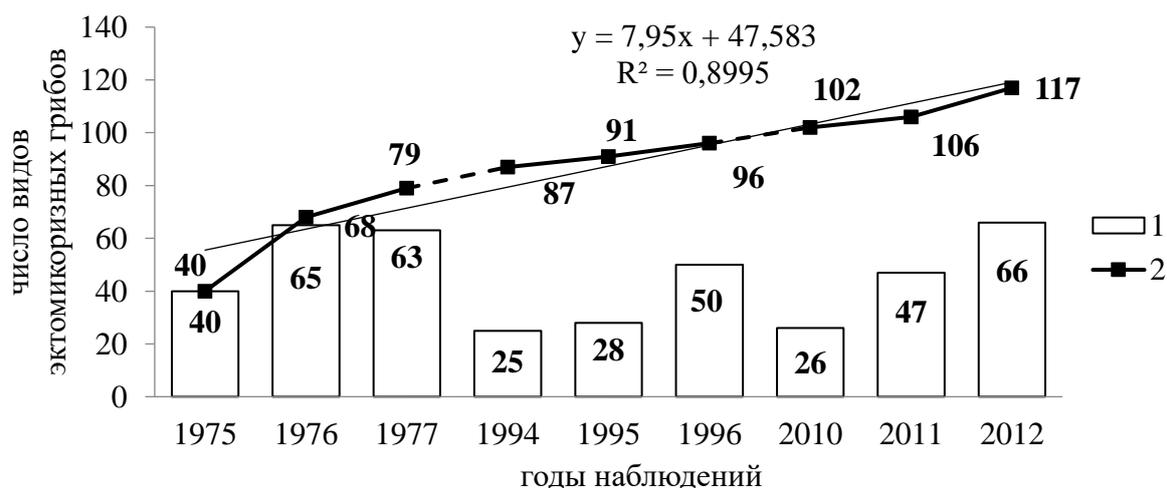


Рисунок 2. Изменение видового разнообразия биоты эктомикоризных грибов по годам наблюдений: 1 – число видов за год наблюдений, 2 – накопление общего выявленного разнообразия (аппроксимация линейной функцией)

Анализируя видовое разнообразие эктомикоризных грибов по годам наблюдений, отметим, что минимальное число видов было выявлено в 1994 г. (25 видов или 21,4% от общего числа видов эктомикоризных грибов), максимальное — в 2012 г. (66 видов или 56,4%) (рисунок 2).

Из 117 видов эктомикоризных грибов, выявленных в березняке разнотравном за все три периода, только 1 вид — *Lactarius theiogalus* — был постоянным и встречался ежегодно, то есть 9 раз, а 30 видов, обнаруживали только 1 раз в какой-либо один год наблюдений.

Анализируя пищевую ценность эктомикоризных грибов в березняке разнотравном, мы выявили, что 60 видов являлись съедобными, они обычно имели крупные плодовые тела. Несъедобными были 42 вида, имеющих небольшие размеры базидиом, либо обладающих неприятным запахом и вкусом. Ядовитых грибов обнаружено 15 видов.

Доминирующие виды грибов определялись отдельно по числу и по биомассе базидиом. В березняке разнотравном за все время исследований выявлено 5 видов эктомикоризных грибов, доминирующих по числу базидиом (42,9% от общего количества доминантов по числу базидиом), и 16 видов — по биомассе базидиом (64,0% от общего числа доминантов по биомассе). В разные периоды доминировали: *Boletus betulicola* (= *Boletus edulis* f. *betulicola*), *Collybia butyracea* var. *asema* (= *Rhodocollybia butyracea*), *Lactarius theiogalus*, *Leccinum scabrum*, *Russula betularum*, *R. delica*, и некоторые другие. Число доминантов по биомассе базидиом варьировало по периодам от 3 до 11, по числу базидиом — от 2 до 4. Одновременно во все периоды по числу базидиом доминировало только два вида *Laccaria laccata* и *Lactarius theiogalus*. По биомассе базидиом, видов грибов доминирующих в каждый сезон наблюдений не выявлено. Видовой состав доминантов по числу базидиом к III периоду наблюдений существенно не изменяется. Коэффициенты общности, вычисленные для доминантов разных периодов по числу базидиом, варьировали от 50 до 60 ($J_{I-II} = 60$, $J_{II-III} = 50$, $J_{I-III} = 50$). Однако, видовой состав доминантов по биомассе подвергался значительной трансформации. Коэффициенты общности, колебались от 0 до 20 ($J_{I-II} = 20$, $J_{II-III} = 0$, $J_{I-III} = 8$).

Число базидиом эктомикоризных грибов и их суммарная биомасса в разные периоды исследований значительно варьируются. В I период наблюдений отмечена наибольшая биомасса грибов (13,4 кг/га). Зафиксировано массовое развитие грибов с крупными плодовыми телами: *Amanita muscaria*, *Boletus betulicola* (= *Boletus edulis* f. *betulicola*), *Russula betularum* и другие. Во II период происходит снижение продуктивности эктомикоризных грибов по биомассе (8,5 кг/га), а к третьему периоду вновь возрастает (11,2 кг/га). По числу базидиом максимальные «урожаи» были во II период исследований (30,6 тыс. шт/га), минимальные — в III период (7,5 тыс. шт/га). По годам наблюдений, также отмечаются большие вариации «урожая» грибов, что связано с погодными условиями не только текущего года, но и предыдущих лет. Например, резкое увеличение «урожайности» грибов по биомассе и количеству наблюдалось в 1976 г. после засушливого 1975 г. Максимальные показатели «урожайности» микоризообразователей по числу и биомассе базидиом выявлены в 1976 и 1996 гг. Самыми низкоурожайными были засушливые 1994, 2010, и 2011 гг.

В изучаемом биогеоценозе по годам наблюдений, статистически значимых корреляций характеристик микобиоты эктомикоризных грибов, с погодными условиями текущего года не выявлено. Отмечено влияние на микобиоту метеорологических показателей по декадам наблюдений. Так, повышение количества осадков в июне приводит к снижению общей биомассы эктомикоризных грибов в августе ($r_s = -0.57$; $p < 0.05$). А при повышении средней месячной температуры воздуха в июле ($r_s = -0.47$; $p < 0.05$) наблюдается снижение числа базидиом эктомикоризных грибов в августе.

Таким образом, в березняке разнотравном в 2010–2012 гг. выявлен 81 вид микоризообразующих грибов, входящих в состав 19 родов и 8 семейств. Общий список эктомикоризных грибов березняка разнотравного за все три периода достиг 117 видов. Лидирующими по числу видов эктомикоризных грибов за все время исследований были сем. *Cortinariaceae*, *Russulaceae*, *Tricholomataceae*, и *Boletaceae*, что подчеркивает бореальный характер исследуемой территории. Наибольшее число видов микоризообразователей отмечено в родах: *Cortinarius*, *Russula*, *Inocybe*, *Lactarius*, и *Amanita*, что характерно для подзоны южной тайги. Новыми для березняка разнотравного в третий период наблюдений являлись 20 видов эктомикоризных грибов, из них 3 вида оказались новыми для Пермского края.

Видовой состав эктомикоризных грибов с течением времени меняется в большей степени ($J = 43\text{--}49$), чем видовой состав высших сосудистых растений. Установлено, что с течением времени происходит сближение видового состава эктомикоризных грибов разных периодов исследований, что свидетельствует о наличии мицелиального континуума во времени. Видовой состав доминантов по числу базидиом к III периоду наблюдений существенно не изменяется ($J = 50\text{--}60$). Однако, видовой состав доминантов по биомассе подвергался значительной трансформации ($J = 0\text{--}20$). Ежегодно, выявляемое число видов и продуктивность эктомикоризных грибов различается по годам наблюдений, и зависит от изменения погодных условий не только текущего года, но и предыдущих лет. Наибольшее число базидиом и их суммарная биомасса зафиксирована в 1976 и 1996 гг. Самыми «низкоурожайными» годами были 1994, 2010, и 2011 гг., так как, являлись самыми засушливыми.

Библиографический список

1. Переведенцева Л.Г. Биота, и экология агарикоидных базидиомицетов Пермской области: автореф. дис. ...докт. биол. наук. М.: Наука, 1999. 48 с.
2. Шубин В.И. О плодоношении эктомикоризных грибов // Хвойные бореальной зоны. 2009. Т. 26. № 1. С. 29–32.
3. Грейг-Смит П. Количественная экология растений. Перев. с англ. М.: Изд-во Мир, 1967. 359 с.
4. Bochs G., Babos M. Coenology of terricolous macroscopic fungi of deciduous forests. Contributions to our knowledge of their behavior in Hungary // Bot. Jahrb. System. Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie. 1960. В. 80. № 1. S. 1–100.
5. Коваленко А.Е. Экологический обзор грибов из порядков Polyporales s. str., Boletales, Agaricales s. str., Russulales в горных лесах центральной части Северо-Западного Кавказа // Микология и фитопатология. 1980. Т. 14. Вып. 4. С. 300–314.
6. Moser M. Die Rohrlinge und Blätterpilze (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales) // Kleine Kryptogamenflora. Bd. 2b. 2. Stuttgart, New York. 1983. 533 S.
7. MycoBank Database [Электронный ресурс]. URL: <http://www.mycobank.org> (дата обращения: 29.08.2020).
8. Трухачёва Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 384 с.
9. Грибные сообщества лесных экосистем / под ред. В.Г. Стороженко, А.В. Руоколайнен, А.В. Кикеевой. М.; Петрозаводск, 2018. Т. 5. 163 с.

АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ ДВУХ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ИЗ РОДА *PULSATILLA* MILL

Шлыков С.А., Бельтюкова Н.Н.

ПГНИУ Пермский государственный национальный исследовательский университет, г.Пермь, Россия.

Ключевые слова: *Pulsatilla* Mill, редкий вид, популяционная структура.

Охрана растительного мира – одна из главнейших задач настоящего времени [1]. Проблема сохранения редких видов растений становится все более, актуальной вследствие усиления антропогенного воздействия на окружающую среду. Эта проблема имеет огромное значение, и никогда еще не была столь актуальна, как в наши дни. В первую очередь в охране нуждаются редкие декоративные дикорастущие виды, подвергающиеся наибольшей угрозе уничтожения. Реальной формой существования видов растений, которая привязана к конкретным локусам биосферы – фитоценозам, являются ценопопуляции [2]. Вне фитоценозов популяции не могут существовать, так как все их базовые свойства ценоцически обусловлены [3]. Ценопопуляции имеют сложный состав и специфическую функциональную структуру. Вступая между собой в системные отношения и выполняя интрапопуляционные функции, особи растений придают ценопопуляциям внутреннюю целостность [4].

Изучение ценопопуляций необходимо в деле охраны редких и исчезающих видов растений, поскольку при этом большое значение имеет охрана их местообитаний, так как каждый вид занимает определенное место в сложной цепи взаимосвязей, выполняет в природе важную роль. Кроме того, именно популяция является элементарной единицей эволюции и взаимодействия между особями [3].

Для разработки стратегии сохранения редких видов растений необходимо иметь максимально полную информацию об уровне генетической изменчивости популяций этих видов. Все мероприятия по реинтродукции и поддержанию оптимальной численности особей в популяциях должны предполагать восстановление аллельного состава и генетической структуры каждой конкретной популяции [4].

Один из редких декоративных родов флоры Урала, имеющих практическое значение, относится *Pulsatilla* Mill – прострелы из семейства *Ranunculaceae* – лютиковые.

Из этого рода изучался прострел раскрытый (*Pulsatilla patens* (L.) Mill.) и прострел желтеющий (*Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz.)

Pulsatilla patens (L.) Mill. - весьма декоративное растение как при цветении, так и в плодах. Культивируется в цветниках (наряду с другими видами прострела).

Препараты растения употребляют как успокаивающее и снотворное средство [6].

В народной медицине сон-трава употребляется от многих болезней. Водный экстракт травы прострела оказывает сильное бактерицидное и фунгицидное действие и используется наружно для быстрого заживления ран и при грибковых заболеваниях кожи. Отвар травы пьют в малых дозах при кашле и женских заболеваниях. Настойка водки на траве применяется в качестве растирания при ревматизме. Свежую траву варят в печке без воды и выделившимся соком лечат ожоги.

Pulsatilla flavescens (Zucc.) Juz. - декоративное и лекарственное растение, содержит алкалоиды, ядовито. Местное население использует прострел желтеющий при суставных болезнях: готовят настойки из нераспустившихся цветков растения. Прострел считают сильным средством для лечения функциональных заболеваний нервной системы.

Широкое практическое использование видов рода *Pulsatilla* Mill. привело к тому, что многие из них стали редкими и исчезающими, и нуждаются не только в охране, но и во всестороннем изучении. Многие его виды – включая выше рассмотренные – находятся во второй категории редкости, и интенсивно собираются населением в массовом количестве весной как раннецветущее растение. Сокращению численности, кроме сборов на букеты, способствуют распашка лугов и лесозаготовки [2].

Данная работа посвящена изучению ценопуляций двух видов растений для оценки и сравнения полученных данных с предыдущими и для будущих исследований.

Методика исследования

Подсчет числа особей проводился по методике, изложенной в «Программе и методике наблюдений за ценопуляциями видов растений Красной книги СССР» (Денисова и др., 1986). Обводилась исследуемая площадь, в этой площади происходил подсчет количества особей исследуемых видов, после чего вычислялось среднее число особей на один квадратный метр по формуле:

$$P=S/n$$

Где n – количество особей, S – исследуемая площадь.

Возрастные спектры ценопуляций *P. patens* и *P. Flavescens* определялись по классификации А.А. Уранова (1975) материалами статьи “Особенности онтогенеза и возрастной структуры популяций *Pulsatilla patens*” (Зонтиков, Зонтикова и др., 2013) [5]. В связи с тем, что растения охраняемые, проводились морфологические описания только надземных органов.

Антропогенное воздействие рассчитывалось по методике Мансуровича У. Б. (подходы и методы оценки интенсивности антропогенного воздействия на окружающую среду) [7], и оценивалось по следующим показателям:

1. Число людей, посетивших ценопуляцию за один месяц;
2. Количество бытовых отходов;
3. Расстояние до дороги и количество троп.

Результаты

Первая ценопуляция, *Pulsatilla patens* (L.) Mill, расположена в “Сосновом бору”, который расположен в Кировском районе между улицами Маршала Рыбалко и Кировоградская. На территории Соснового бора произрастает более 30 видов лекарственных растений. Сосновые насаждения способствуют уничтожению патогенной флоры и способствуют оздоровлению местной фауны. Имеются редкие виды растений, занесенные в список особо охраняемых видов Пермской области [1].

Была взята площадь в 3000 м². Общая численность *Pulsatilla patens* (L.) Mill составила 86 особей, с плотностью размещения в 0,03 шт./м².

Вторая ценопуляция около заказника Предуралье. Растительность заказника относится к подзоне широколиственно-пихтово-еловых лесов и непосредственно соседствует с Кунгурско-Красноуфимским лесостепным геоботаническим округом. Кроме того, благодаря своеобразному геологическому строению, рельефу, почвенному покрову и микроклиматическим условиям здесь большое разнообразие растительного покрова [1]. Так же в этой области наблюдается сочетание бореально-таежных, неморальных элементов широколиственных лесов, степных, лугово-степных, горно-степных, водных и прибрежно-водных комплексов.

Была взята площадь в 1500 м². Общая численность *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz составила 154 особи, с плотностью размещения в 0,1 шт./м².

Абсолютный максимум растений в обеих популяциях приходится на средневозрастную генеративную онтогенетическую группу. В популяции Соснового бора

они приходятся на 44% (36 штук) от общей численности популяции, проростки – 11 (12%) особей, ювенильных – 7 (7%), имматурных 9 (9%), виргинильных 9 (9%), молодых генеративных 9 (9%), старовозрастных генеративных 8 (8%), сенильных 2 (2%). Во второй популяции они приходятся на 47% (68 штук), остальные – проростки 21 (13%), ювенильные 17 (10%), имматурные 12 (7%), виргинильные 12 (8%), молодые генеративные 15 (9%), старовозрастные генеративные 7 (5%) и сенильные 2 (1%)

В ценопопуляции соснового бора отмечена высокая посещаемость людьми (более 100 за месяц). В следствии высокой посещаемости людьми так же наблюдалось наличие тех или иных групп отходов и единичных, разбросанных по площади ценопопуляции. Так же ценопопуляция располагается вблизи дороги и на всей изученной площади имела густую сеть троп. В целом территория, которая занимается популяцией, испытывает сильную антропогенную нагрузку – сбор ягод и грибов, работы по санитарной прочистке леса, противопожарные мероприятия (минерализованные полосы и рвы).

На территории изученной ценопопуляции заказника наблюдалась, по косвенным признакам (следы, бытовые отходы), средняя (меньше 100) посещаемость людьми. Отмечены единичные бытовые отходы на границах исследуемой площади и наличие немногочисленных троп. Сама изучаемая ценопопуляция располагалась в значительном расстоянии от дороги (больше 500 метров).

Таким образом, в изученных ценопопуляциях прострела желтеющего и прострела раскрытого были определены плотность расположения особей в популяции, численность и возрастной спектр, антропогенное воздействие.

Библиографический список

1. Акимов, В. А. Подкаменная гора /В. А. Акимов, Л. И. Афанасьева, Г. А. Воронов, В. П. Левковский, Н. Г. Циберкин, С. П. Стенно // Особо охраняемые природные территории Пермской области: Реестр / Отв. Ред. С.А. Овеснов. - Пермь: Книжный мир, 2002. - 464 с. ISBN 5-93824-015-8.
2. Алтухов, Ю.П. Генетика популяций и сохранение биоразнообразия // Соросовский общобразовательный журнал. 1995. № 1. – С. 32-43.
3. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях – М.: ИКЦ «Академ-книга», 2003. - С. 431
4. Артюкова, Е.В. Анализ генетической изменчивости редкого эндемичного вида *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) на основе RAPD-маркеров / Е.В. Артюкова, А.Б. Холина, М.М Козыренко // Генетика. 2004б. Т. 40. №7. - С. 877-884.
5. Зонтиков Д. Н., Зонтикова С. А., Сергеев Р. В. Особенности онтогенеза и возрастной структуры популяции *Pulsatilla Pattens* (L.) Mill - Научный журнал КубГАУ, №93(09), 2013 года
6. Горчаковский П.Л., Шурова Е.А.Редкие и исчезающие растения Урала и Приуралья - Институт экологии растений и животных УрО РАН, 1982. – С. 206
7. Усманов Б. М. Подходы и методы оценки интенсивности антропогенного воздействия на окружающую среду // Экологический Консалтинг, 2003. – с. 5-13

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Drčar P., Starčič Erjavec M.</i> PREPARATION OF CIPROFLOXACIN RESISTANT <i>ESCHERICHIA COLI</i> STRAIN N4i	5
<i>Predojević L, Kreft M.E., Keše D , Kuznetsova M.V. , Starčič Erjavec M.</i> IN VITRO PATHOGENICITY AND CYTOKINE RELEASE ASSESSMENT OF AVIAN PATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> STRAINS ON THE BIOMIMETIC PORCINE UROTHELIUM MODEL	8
<i>Starčič Erjavec M.</i> REMARKABLE PLASMIDS – THE STORY OF pRK100	11
<i>Абдуллина Р.Х., Прохоренко Н.Б., Тимофеева О.А.</i> ВИТАЛИТЕТНАЯ СТРУКТУРА ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ <i>HELICHRYSUM ARENARIUM</i> (L.) MOENCH В УСЛОВИЯХ ПРЕДГОРНОЙ ЛЕСОСТЕПНОЙ ЗОНЫ КРЫМА	15
<i>Абу Дийак К.Т.</i> СЕНСОРНЫЕ ПОЛЯ НА АНТЕННАХ РУЧЕЙНИКОВ СЕМЕЙСТВА HYDROPSYCHIDAE (TRICHOPTERA: ANNULIPALPIA)	18
<i>Акинфиева А.А.</i> К ИЗУЧЕНИЮ СПЕКТРА ПИТАНИЯ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ В ЛЕСОСТЕПНОМ ЗАУРАЛЬЕ	21
<i>Акосах Й.А., Марданова А.М.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОМИЦЕТОВ РОДА <i>FUSARIUM</i> - ВОЗБУДИТЕЛЕЙ УВЯДАНИЯ И СУХОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ. .	24
<i>Алеев В.С., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.</i> НОВЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА SALINISPHERACEAE, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ РУДНИКА ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ	28
<i>Антех Д.Д., Тимофеева О.А.</i> ВЛИЯНИЕ ГУМАТА НА НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В КАПУСТЕ КЕЙЛ	32
<i>Ахунзянова И.Р., Елькин А.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б.</i> БИОРЕМЕДИАЦИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОГО ШЛАМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ <i>RHODOCOCUS</i> -БИОКАТАЛИЗАТОРА	35
<i>Бажутин Г.А., Тюмина Е.А., Ившина И.Б.</i> БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ИБУПРОФЕНА КЛЕТКАМИ <i>RHODOCOCUS CERASTII</i> ИЭГМ 1243	42
<i>Баландина А. В., Шурпик Д. Н., Падня П. Л., Зеленихин П.В., Стойков И.И.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПИЛЛАР[5]АРЕНОВ AUI-87 И AUI-97 В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК ВТ-20	47
<i>Безматерных К.В., Смирнова Г.В., Самойлова З.Ю., Ушаков В.Ю., Музыка Н.Г., Октябрьский О.Н.</i> ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТОВ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ	48
<i>Бельтюкова Н.Н., Томилова Ю.О., Ульянов В.А., Бейшова И.С., Султангазина Г.Ж., Бейшов Р.С.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХ РЕДКИХ ВИДОВ РОДА <i>ADONIS</i> L. СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МЕТОДА	53
<i>Богуш Е.В., Крылова И.О.</i> БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНДИКАТОРЫ ДИСБАКТЕРИОЗА У ЩЕНКОВ БЕЛЬГИЙСКОЙ ОВЧАРКИ (МАЛИНУА)	57
<i>Бражкина П.С., Алёшин М.А., Ткачук К.С.</i> РЕАКЦИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПОЧВЫ НА РАЗЛОЖЕНИЕ ПОЖНИВНО-КОРНЕВЫХ ОСТАТКОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР	59

<i>Булавина М.И., Артамонова В.С.</i> О ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ, ФОРМИРУЮЩИХСЯ НА ТЕХНОГЕННЫХ ОТХОДАХ	64
<i>Вартанян Д.О., Ерзаева А.С., Рогов С.А.</i> ПОПУЛЯЦИОННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АДОНИСА ВЕСЕННЕГО В СОСТАВЕ ПАМЯТНИКОВ ПРИРОДЫ РЕГИОНАЛЬНОГО ЗНАЧЕНИЯ САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПИРОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА ПОЧВЕННО-РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПОКРОВ	70
<i>Власов С.В.</i> ОЛИГОХЕТОЦЕНОЗЫ РЕКИ ОЧЁР	73
<i>Галанов А.Э., Моисеева К.В.</i> ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТИМУЛЯТОРОВ КОРНЕВОГО РОСТА ПРИ ВЕГЕТАТИВНОМ РАЗМНОЖЕНИИ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО	75
<i>Гизатуллина Ю.С., Ваньков Н.В., Головкова А.А., Степанова О.А., Ремезовская Н.Б.</i> БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ...	78
<i>Глебездина Н.С.</i> ЗНАЧЕНИЕ МЕЛАТОНИНА В РЕГУЛЯЦИИ НК-КЛЕТОК	82
<i>Глебездина Н.С., Некрасова И.В., Олина А.А., Куклина Е.М.</i> МЕЛАТОНИН-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ Th17 В ПЕРИОД ГЕСТАЦИИ	87
<i>Гребёнкина Е.И., Новоселова Л.В.</i> ОСОБЕННОСТИ ВЕСЕННЕГО ПЕРИОДА ПЫЛЕНИЯ В ГОРОДЕ КИРОВ В 2020 Г.	91
<i>Елькина Е.Б., Руцак С.А.</i> ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УЧИТЕЛЯ-ЛОГОПЕДА И ПЕДАГОГА-ПСИХОЛОГА В КОРРЕКЦИОННОЙ РАБОТЕ С ДЕТЬМИ С ОВЗ В ДОУ	94
<i>Журавлева Д.Э., Исхакова З.И., Каюмов А.Р.</i> ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ НОВОГО РІІ-ПОДОБНОГО БЕЛКА pOтN ИЗ <i>LACTOBACILLUS NITGARDII</i>	99
<i>Заморина С.А., Ужвиюк С.В., Шардина К.Ю., Кропанева М.Д., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Храмцов П.В., Раев М.Б.</i> ГЛИКОДЕЛИН КАК ФАКТОР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК	102
<i>Зиганишина Э.Э., Булынина С.С., Ахметова Р.Ф., Зиганишин А.М.</i> РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ <i>TETRADESMUS OBLIQUUS</i>	103
<i>Инчагова К.С.</i> ПРИМЕНЕНИЕ QUERCETIN HYDRATE И TRANS-CINNAMALDEHYDE В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ «QUORUM SENSING» LUXI/LUXR-ТИПА У БАКТЕРИЙ	106
<i>Кабдрахимов А.А.</i> К ФАУНЕ ГЕРПЕТОБИНТНЫХ ПАУКОВ (ARANEI) СОСНОВЫХ ЛЕСОПОСАДОК ПУСТЫННОЙ ЗОНА ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ	108
<i>Кадочникова Я.А.</i> ВЛИЯНИЕ ЭНДОМОРФИНА 2 НА ФУНКЦИИ МОНОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ	111
<i>Карасева О.С., Юдина Ю.Ю., Яруллина Д.Р.</i> АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ <i>LACTOBACILLUS</i> ПРОТИВ <i>MORGANELLA MORGANII</i>	114
<i>Кардакова В.М.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ИЗ СЕМЕЙСТВА <i>PPAR</i> У ДЗЮДОИСТОВ Г. ПЕРМИ	116

<i>Каримова Н.В., Гизатуллина Ю.С., Дубенкова Д.Д., Кузнецова М.В.</i> ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ В УСЛОВИЯХ СТАЦИОНАРА	118
<i>Карпова А.Ю., Зорина Т.А., Горбушина Е.Р.</i> ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ ПОЧВЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ	122
<i>Каюмов А.Р., Тризна Е.Ю., Байдамышина Д.Р., Сабирова А.Э.</i> БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ: РАЙ ДЛЯ БАКТЕРИЙ ИЛИ ВЫЗОВ ИНФЕКТОЛОГИИ XXI ВЕКА	126
<i>Кислый А.А.</i> РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КРАСНОСЕРОЙ ПОЛЕВКИ <i>CRASEOMYS</i> <i>RUFOCANUS</i> (SUNDEVALL, 1846) НА РАВНИННЫХ И ГОРНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ	129
<i>Коновалова К.Ю.</i> ФАУНА МЛЕКОПИТАЮЩИХ ИЗ МЕСТОНАХОЖДЕНИЯ РОЖДЕСТВЕНСКОЕ ГОРОДИЩЕ (ПРИКАМЬЕ)	134
<i>Корнилова Е.А., Безволенко В.С.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ СИЛЫ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ПРИ ПРОЯВЛЕНИИ АГРЕССИИ НА ЧЕЛОВЕКА	137
<i>Костенникова З.С., Гритчина Т.Е., Акосах Й.А., Марданова А.М.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕЛЛЮЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛЯТОВ <i>FUSARIUM</i> <i>SPP.</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ КАРТОФЕЛЯ	142
<i>Краснова М.Е., Переляева Е.В., Моргунова М.М., Бельшенко А.Ю., Тимофеев М.А.,</i> <i>Аксёнов-Грибанов Д.В.</i> ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДОВ <i>STREPTOMYCES</i> И <i>RHODOCOCCLUS</i> , КУЛЬТИВИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО ОКСИДАТИВНОГО ФОНА	146
<i>Крашенинников А.Б.</i> БАРКОДИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ АМФИБИОТИЧЕСКИХ И ВОДНЫХ ЧЛЕНИСТОНОГИХ АРХИПЕЛАГА НОВАЯ ЗЕМЛЯ И ПРИЛЕГАЮЩИХ ТЕРРИТОРИЙ	149
<i>Кузнецова Д.С., Куюкина М.С.</i> БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ИНДЕНА АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА <i>RHODOCOCCLUS</i>	152
<i>Лапкина Е.З., Савельева Е.Е., Булгакова Н.А.</i> АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СЕЛЕНОБОГАЩЕННЫХ ПРОРОСТКОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР	154
<i>Логинова О.А., Орлова Е.Г., Ширшев С.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ГОРМОНОВ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА, В КОНЦЕНТРАЦИЯХ, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ БЕРЕМЕННОСТИ, В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ Т-ВЕТ И GATA-3 Т- ЛИМФОЦИТАМИ	157
<i>Макарова М.В., Куюкина М.С.</i> СКРИНИНГ УСТОЙЧИВЫХ К ТЕТРАХЛОРАУРОНОВОЙ КИСЛОТЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ РОДОКОККОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА	162
<i>Мальшикина Е.Е.</i> ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА <i>BETULA PUBESCENS</i> ENRH. В ПЕРМСКОМ КРАЕ	165

<i>Мальцева А.Е.</i> РОЛЬ ФОТОПЕРИОДА В ПРОДУКЦИИ МЕЛАТОНИНА И РЕАЛИЗАЦИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ КОНТИНЕНТАЛЬНОГО КЛИМАТА	167
<i>Марченко Д.М., Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Шмагель К.В.</i> ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ФОРМУЛЫ И АБСОЛЮТНОГО КОЛИЧЕСТВА ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОСТРУЮ СТАДИЮ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ	170
<i>Масленникова И.Л.</i> ДЕЙСТВИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ СМЕШАННОЙ БИОПЛЕНКИ <i>ESCHERICHIA COLI</i> И <i>STARNYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i> НА ФОНЕ ПОВЫШЕННОГО ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ	173
<i>Некрасова И.В.</i> РЕГУЛЯЦИЯ ЭСТРИОЛОМ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ ТИМИЧЕСКИХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ iNKT КЛЕТОК	177
<i>Новокрещенова А.С., Галкина А.С.</i> ПОЙМЕННЫЕ ЭКОСИСТЕМЫ РЕКИ САМАРЫ КАК КОМПОНЕНТ УРБАНИЗИРОВАННОЙ СРЕДЫ (В ЧЕРТЕ Г.О. САМАРА)	180
<i>Норов А.И., Садыкова Ю.Р.</i> ТИРОКСИН И БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ У СЛУЖЕБНЫХ БЕЛЬГИЙСКИХ ОВЧАРОВ (МАЛИНУА) В ПЕРИОД ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ	183
<i>Овчанкова Н.Б.</i> ИНВЕРСИЯ ЗУБНОГО ЗАМКА СРЕДИ ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ ПОДСЕМЕЙСТВ <i>PISIDIINAE</i> И <i>SPHAERIINAE</i> (СЕМ. <i>SPHAERIINAE</i>)	186
<i>Олехова И.В., Новоселова Л.В.</i> БИОРАЗНООБРАЗИЕ СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ СЕРЕБРЯНСКОГО ПАРКА Г. ПЕРМИ	190
<i>Орлова Е.Г., Логинова О.А., Ширшев С.В.</i> РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ГОРМОНОВ В КОНТРОЛЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА НАТУРАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК (nTh17, nTreg, iNKT) ТИМУСА	192
<i>Пастухова Л.А., Казаковцев В.В.</i> ВЛИЯНИЕ НАСТОЯ ЧАГИ В КОРМЕ НА НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЛУЖЕБНЫХ СОБАК	196
<i>Пахоруков И.В.</i> СОСТАВ ОБМЕННЫХ КАТИОНОВ ВТОРИЧНО ЗАСОЛЕННЫХ АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ	200
<i>Переляева Е.В., Краснова М.Е., Моргунова М.М., Бельшенко А.Ю., Тимофеев М.А., Аксенов-Грибанов Д.В., ШТАММ STREPTOMYCES SP. IB2019K190-4, КУЛЬТИВИРОВАННЫЙ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ С ОТХОДАМИ ЛЕСОПИЛЕНИЯ, КАК ПРОДУЦЕНТ ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ NFAT 133</i>	203
<i>Печенкина К.О., Щипанова Е.А.</i> ЛИШАЙНИКИ ПРОЕКТИРУЕМОЙ ООПТ «СЕРЕБРЯНСКИЙ ПАРК» ГОРОДА ПЕРМИ	206
<i>Писцова О. Н. , Куюкина М.С.</i> УСТОЙЧИВОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА <i>RHODOCOCCUS</i> К ВОЗДЕЙСТВИЮ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ. .	209
<i>Плакхина Е.В.</i> ФЕНОЛОГИЯ <i>ALLOMENGEA SCOPIGERA</i> (GRUBE, 1859) ГОСУДАРСТВЕННОГО ЗАПОВЕДНИКА «БАСЕГИ»	213
<i>Поспелова А.Д.</i> МУРАВЬИ КУНГУРСКОЙ ЛЕСОСТЕПИ	217

<i>Пьянкова А.А., Шанина С.Н., Игнатович О.О., Плотникова Е.Г.</i> МИКРООРГАНИЗМЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ КАЛИЙНЫХ СОЛЕЙ ЯКШИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ (РЕСПУБЛИКА КОМИ)	220
<i>Рудик Н.И.</i> ДИАГНОСТИРОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВЛАЖНОСТИ ПАХОТНОГО ГОРИЗОНТА ЧЕРНОЗЕМНЫХ ПОЧВ, ВЫЯВЛЕННОЕ ПО ДАННЫМ МУЛЬТИСПЕКТРАЛЬНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СЪЕМКИ	223
<i>Сагидуллина В.И., Хасанова Р.А., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.</i> ПОДБОР УСЛОВИЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ КЛЕТОК <i>ESCHERICHIA COLI</i> С ЦЕЛЬЮ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ	227
<i>Сальникова О.П., Фатьянова А.В., Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф.</i> ВЛИЯНИЕ НОВОГО ПРОТИВОВИРУСНОГО АГЕНТА КАМФЕЦИНА НА МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОРРЕЛЯТЫ ОБМЕНА БИЛИРУБИНА	230
<i>Сидоров Р.Ю., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г.</i> МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ПРИРОДНОГО СОЕДИНЕНИЯ ЭРОГОРГИАЕНА, ИНГИБИТОРА МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ.	236
<i>Смирнова А.Б., Смирнова А.В.</i> ЧИСЛЕННОСТЬ И ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ КИШЕЧНОГО РАЙОНА	241
<i>Тиунов А.В.</i> ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЛИНЕЙНЫХ РАЗМЕРОВ ТЕЛА ПАУКОВ-КРУГОПРЯДОВ <i>ARANEUS DIADEMATUS</i> CLERCK, 1757 И <i>A. MARMOREUS</i> CLERCK, 1757 (ARANEAE: ARANEIDAE)	247
<i>Тищенко А.В., Литвиненко Л.В., Ившина И.Б.</i> ВЛИЯНИЕ <i>RHODOCOCCLUS</i> -БИОСУРФАКТАНТОВ НА ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ СЕМЯН РАСТЕНИЙ К ИОНАМ ЦИНКА.	252
<i>Триандафилова Г. А., Смирнова Г. В., Ботева А. А., Октябрьский О.Н.</i> ВЛИЯНИЕ РЯДА АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИЙ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	259
<i>Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Музыка Н.Г., Октябрьский О.Н.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БЫСТРОГО ОТВЕТА <i>ESCHERICHIA COLI</i> НА ДЕЙСТВИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА	262
<i>Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Ушаков В.Ю., Октябрьский О.Н.</i> ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ РЕДОКС-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ГОЛОДАНИИ ПО ФОСФАТУ У <i>ESCHERICHIA COLI</i>	266
<i>Усанина Д.И., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.</i> КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ ГЛИНИСТЫХ ОТЛОЖЕНИЙ РУДНИКА ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ.	269
<i>Федоров А.М.</i> ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ НЕГАТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАСТИТЕЛЬНОСТЬ ОРБИТОЦЕНОЗОВ В ГОРОДЕ ИЖЕВСКЕ.	273
<i>Филатова В.Н., Моисеев Е.А., Моисеева К.В.</i> БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ГОРОДСКОЙ СРЕДЫ.	276
<i>Филиппова А.С.</i> БРЮХОНОГИЕ МОЛЛЮСКИ ТРОИЦКОГО ЗАКАЗНИКА И ЕГО ОКРЕСТНОСТЕЙ.	279

<i>Хаова Е.А., Ткаченко А.Г.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА <i>StrA</i> КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ФАКТОРА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЕРСИСТЕНЦИИ.	283
<i>Храмцов П.В.</i> ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ХЕЛАТОВ ЕВРОПИЯ.	288
<i>Храмцов П.В., Калашикова Т.В.</i> РАЗЛИЧНЫЕ СПОСОБЫ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ МЕТОДОМ ДЕСОЛЬВАТАЦИИ, МОГУТ ДАВАТЬ ОШИБОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ.	289
<i>Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г.</i> ПОЛИАМИНЫ СПОСОБСТВУЮТ ИЗМЕНЕНИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ МИКОБАКТЕРИЙ.	290
<i>Чедова Е.Е., Годовалов А.П.</i> ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНЫХ ПРОДУКТОВ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ <i>LACTOBACILLUS</i> SPP.	293
<i>Черевко Л.С.</i> ФАКТОРЫ, ФОРМИРУЮЩЕЕ ПОВЕДЕНИЕ ЛЕМУРОВ ВАРИ (<i>VARESCIA</i> , <i>LEMURIDAE</i>) В НЕВОЛЕ.	297
<i>Чернышова И.Е., Сарейкина А.В.</i> РОЛЬ ПАСКВАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ НА ПОЧВЕННО-РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПОКРОВ В ПОПУЛЯЦИОННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АДОНИСА ВОЛЖСКОГО (САМАРСКАЯ ОБЛАСТЬ)	302
<i>Чертов Н.В., Нечаева Ю.И., Сбоева Я.В., Малышкина Е.Е., Пыстогова Н.А.</i> ПОЛИМОРФИЗМ ISSR-PCR МАРКЕРОВ ПЯТИ ПОПУЛЯЦИЙ ЗАПАДНОЙ РАСЫ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ (<i>LARIX SIBIRICA</i> LEDEB.) В ПЕРМСКОМ КРАЕ.	305
<i>Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г.</i> БАКТЕРИИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА, ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ.	307
<i>Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Лопатина А.С., Щетко В.А.</i> МОДЕЛЬНЫЕ ДОЛГОВРЕМЕННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО БИОДЕСТРУКЦИИ КОРОДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ ИСКУССТВЕННЫМИ СООБЩЕСТВАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ.	313
<i>Шиншигин А.С.</i> МОНИТОРИНГ ЭКТОМИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ БЕРЕЗНЯКА РАЗНОТРАВНОГО В ЮЖНОТАЕЖНЫХ ЛЕСАХ ПЕРМСКОГО КРАЯ	318
<i>Шлыков С. А., Бельтюкова Н.Н.</i> АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ ДВУХ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ИЗ РОДА <i>PULSATILLA</i> MILL	324

Научное издание

СИМБИОЗ-РОССИЯ 2020

Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов
с международным участием
(Пермь, 28–30 сентября 2020 г.)

Публикуется в авторской редакции
Компьютерная верстка *А. Б. Крашенинникова*

Подписано в печать 08.10.2020. Формат 60×84/8.
Усл. печ. л. 38,71. Тираж 150 экз. Заказ № 26.

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

Отпечатано в ООО Учебный центр “Информатика”
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15

