

ПЕРМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОИНФОРМАТИКИ,
БИОТЕХНОЛОГИИ И НЕДРОПОЛЬЗОВАНИЯ**

Сборник статей всероссийской научной
конференции с международным участием
(18–20 октября 2021 года, г. Пермь)



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ
БИОИНФОРМАТИКИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И НЕДРОПОЛЬЗОВАНИЯ**

*Сборник статей всероссийской научной конференции
с международным участием
(18–20 октября 2021 года, г. Пермь)*



Пермь 2021

УДК [575+60+504.062]я43
ББК 28.0+26.0
Ф94

Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и
Ф94 недропользования [Электронный ресурс] : сборник статей всероссийской научной
конференции с международным участием (18–20 октября 2021 года, г. Пермь) / гл.
ред. А. А. Елькин; отв. ред. М. Я. Лямин; Пермский государственный национальный
исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2021. – 7 Мб; 186 с.
– Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/sborniki/fundamentalnye-i-prikladnye-aspekty-bioinformatiki-biotekhnologii-nedropolzovaniya.pdf>. Заглавие с экра-
на. doi 10.17072/fpabbn-2021

ISBN 978-5-7944-3716-4

Материалы конференции отражают результаты исследований по биоинформатике, биотехнологии, недропользованию, экологии, генетике, медицине. Статьи сборника охватывают широкий спектр научных проблем и представляют интерес для научных работников, преподавателей вузов, аспирантов и студентов.

УДК [575+60+504.062]я43
ББК 28.0+26.0

Издается по решению оргкомитета конференции

Главный редактор **А. А. Елькин**

Ответственный редактор **М. Я. Лямин**

Редакционная коллегия

**В. А. Черешнев, М. А. Бакланов, С. В. Боронникова,
О. З. Еремченко, В. Е. Ефимик**

*Подготовлено при финансовой поддержке
ГАУ ДПО «Институт развития образования Пермского края»
в рамках выполнения договора № 21-143/2021 от 27 сентября 2021 г.*

ISBN 978-5-7944-3716-4

© ПГНИУ, 2021

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ОРГКОМИТЕТА

Красильников Д.Г. д. пол. наук, ректор ПГНИУ, Пермь, Россия

СОПРЕДСЕДАТЕЛИ

Зайцева Н.В. академик РАН, научный руководитель “ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения”, Пермь, Россия

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

Черешнев В.А. академик РАН, гл. науч. сотр. ИИФ УрО РАН, зав. кафедрой ПГНИУ, Екатеринбург, Пермь, Россия

ЧЛЕНЫ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСКОЙ ГРУППЫ

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

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

Гаврин А.Ю. PhD, Кембриджский университет, Кембридж, Великобритания

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

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

Ефимик В.Е. к.б.н., доцент, врио заведующего кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия

Жук В.В. к.б.н., доцент, зам. декана по общим вопросам биол. ф-та 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

Коркотян Э.А. PhD, институт Вейцмана, Реховот, Израиль

Любимов А.В. PhD, университет Иллинойса, Чикаго, Иллинойс, США

Лямин М.Я. к.б.н., доцент, зам. декана по научной работе биол. ф-та ПГНИУ, Пермь, Россия

Пешкур Т.А. PhD, университет Стратклайда, Глазго, Великобритания

Пьянков С.В. д.г.н., проректор по научной работе и инновациям ПГНИУ, Пермь, Россия

Розенблат Г. PhD, VP Research & Development Gavan Ltd., Акко, Израиль

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

Фишер С. PhD, университет Эври, Эври, Франция

ЧЛЕНЫ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ

Арисова А.К. аспирант, ПГНИУ, Пермь, Россия

Боталова К.И. зам. декана биол. ф-та по маркетингу и связям с общественностью 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

Иванова К.М. к.б.н., н.с. ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Комарова Л.В., старший преподаватель, ПГНИУ, Пермь, Россия

Крашенинников А.Б.	к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия, с.н.с., ИБПС ДВО РАН, Магадан, 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
Сайдакова Е.В.	д.б.н., н.с. «ИЭГМ УрО РАН», доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Храмцов П.В.	к.б.н., м.н.с. «ИЭГМ УрО РАН», доцент ПГНИУ, Пермь, Россия
Чудинов В.С.	директор ООО «Имбиоком», Пермь, Россия
Шумихин С.А.	к.б.н., директор учебного ботанического сада ПГНИУ, Пермь, Россия

**За содействие в организации конференции
и издании сборника статей благодарим:**

ГАУ ДПО «Институт развития образования Пермского края»
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН
ПО «Всероссийские общества генетиков и селекционеров»
МОО «Микробиологическое общество» ООО «Имбиоком»
ООО «Компания Хеликон»

ACTINOBACTERIAL TRANSFORMATION OF OLEANANE TRITERPENOIDS

Luchnikova N.A.^{1,2}, Ivanova K.M.³, Tarasova E.V.^{1,2}, Grishko V.V.⁴, Ivshina I.B.^{1,2}

¹Perm State University, Perm, Russia

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

³Perm Federal Research Center Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

⁴Institute of Technical Chemistry Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Key words: actinobacteria, *Rhodococcus rhodochrous*, biologically active compounds, triterpenoids, glycyrrhetic acid, oleanolic acid

Drugs derived from secondary plant metabolites make up about 25% of the global pharmaceutical market [1]. Oleanane pentacyclic triterpenoids, in particular oleanolic (OA) and glycyrrhetic (GA) acids, are the most of interest for researchers in medical chemistry and used to obtain derivatives with pronounced antiviral, antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor, and hepatoprotective activities. Along with chemical synthesis, biological methods of OA and GA transformations have been actively developing, which allow to obtain valuable derivatives without the use of aggressive reagents and can be carried out under normal temperature, pressure and pH values. Furthermore, microbial conversion ensures selective modifications of triterpenic molecule sites that are either not modified or poorly modified by chemical transformations [2]. Among the known microbial biocatalysts, members of mycelial fungi are the most studied, but their use on a preparative scale is technologically impossible and dangerous due to the mycelial type of their growth and the ability to produce mycotoxins with pronounced mutagenic and carcinogenic effects. Whereas bacterial catalysts are only represented by a few species of *Bacillus*, *Nocardia* and *Streptomyces* genera, including pathogens, exhibiting catalytic activity at a concentration of OA and GA no more than 0.3 g/L [3]. In this context, it is essential to search for new non-pathogenic bacterial strains able to carry out site-directed transformations of OA and GA. One of the intensively studied groups of microorganisms in terms of biotechnological application is non-pathogenic actinobacteria. Non-mycelial growth, synthesis of biosurfactants, the ability to grow on minimal media, a flexible metabolic system and high oxygenase activity determine the prospects for actinobacteria to be used as perspective biocatalysts for biotransformation of OA and GA [4]. Moreover, the ability of actinobacteria of genus *Rhodococcus* to transform pentacyclic triterpenoid betulin with formation of betulone was previously shown [5]. In this work, 76 strains of actinobacteria from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms (official acronym IEGM; the World Federation of Culture Collections number 285; the Unique Research Facility number 73559; www.iegmc.ru) belonging to the species *Corynebacterium ammoniagenes* (1), *C. glutamicum* (1), *Gordonia terrae* (4), *R. aetherivorans* (1), *R. cercidiphylli* (1), *R. erythropolis* (14), *R. fascians* (2), *R. jostii* (3), *R. opacus* (15), *R. qingshengii* (2), *R. rhodochrous* (6) and *R. ruber* (26) were used. OA ($\geq 98\%$, Acros Organics, USA) and GA ($\geq 98\%$, Shanghai Yuanye Bio-Technology Co, China), dissolved in dimethyl sulfoxide (1:10 mg/ μ L), were used at a concentration of 1.0 g/L.

Bacterial cells were visualized and their morphometric parameters were measured using an Axio Imager M2 microscope (Zeiss, Germany) equipped with an Axiocam 506 Color camera (Zeiss, Germany) in phase contrast mode with a magnification of x1000. To determine the localization of enzymes, crude cell extracts were obtained according to the method described by Tarasova, Grishko, Ivshina, 2017 [6]. The qualitative and quantitative analysis of residual OA and GA and their biotransformation products were carried out by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The screening of collection actinobacterial cultures for the ability to biotransform of 1.0 g/L of OA and GA revealed that only a few representatives of *R. rhodochrous* (5), *R. opacus* (4), *R. jostii* (1), *R. ruber* (1) and *R. ruber* (5), *R. erythropolis* (1), *R. opacus* (1), *R. rhodochrous* (1), respectively, used triterpenoids as the only carbon source. At the same time, only *R. rhodochrous* IEGM 1360 exhibited high catalytic activity to both OA and GA.

Biotransformation of OA using *R. rhodochrous* IEGM 1360 cells continued for 7 days and was accompanied by 78.9% OA metabolization with the formation of 0.9% product with m/z 468.3 ([M]⁺, GC-MS for methylated biotransformation product). The mass spectrum of the obtained compound corresponded to the mass spectrum of the methyl ester of 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid. It is known that 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid has a pronounced *in vivo* antimelanoma [7] and *in vitro* antileishmanial and antitripanosomal effects [8]. The literature describes the formation of 3-oxo-olean-12-en-28-oic acid using actinobacteria *Nocardia iowensis* DSM 45197 as a biocatalyst. However, nocardia exhibited catalytic activity at OA concentration of 0.3 g/L, while the duration of the biotransformation was 13 days [9].

Biotransformation of GA using *R. rhodochrous* IEGM 1360 cells continued for 7 days as well and was accompanied by 72.2% triterpenoid metabolization and the formation of 26.1% of oxidized derivative with m/z 482.4 ([M]⁺, GC-MS for methylated biotransformation product). The mass spectrum of the obtained compound corresponded to that of the methyl ester of 3,11-dioxo-olean-12-en-29-oic acid previously obtained using mycelial fungi *Fusarium lini* (product yield was 4.0%, process duration was 12 days) and having inhibitory activity against lipoxygenase [10].

Using crude cell *R. rhodochrous* IEGM 1360 extracts, the participation of enzymes associated with the cell membrane in the biotransformations of OA and GA was experimentally proved.

Using phase contrast microscopy, the formation of separate cell aggregates on the surface of crystalline particles of triterpenoids was shown. At the same time, no significant changes in the size of cells and the relative area of their cell surfaces were recorded. Probably, the formation of aggregates determines the stable metabolic activity of rhodococci towards complex hydrophobic substrates, providing high catalytic activity under conditions in which single cells are not capable of division and biotransformation of the substrate.

The findings expand the understanding of the catalytic activity of actinobacteria of the genus *Rhodococcus* and their possible use as biocatalysts for biotransformation of hydrophobic polycyclic substrates, including for obtaining of biologically active derivatives of OA and GA.

The work was supported by the RFBR (grant 20-34-90104) and funded by the Russian Federation Ministry of Science and High Education (AAAA-A19-119031890083-9 and AAAA-A19-119112290008-4). The work was carried out using the equipment of The Core Facilities Centers “Research of Materials and Matter” at the PFRC UB RAS.

References

1. Calixto J.B. The role of natural products in modern drug discovery // An. Acad. Bras. Cienc. – 2019. – V. 91. – e20190105.
2. Shah S.A.A., Tan H.L., Sultan S., Faridz M.A.B.M., Shah M.A.B.M., Nurfazilah S., Hussain M. Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – V. 15. – P. 12027–12060.
3. Luchnikova N.A., Grishko V.V., Ivshina I.B. Biotransformation of oleanane and ursane triterpenic acids // Molecules. – 2020. – V. 25. – 5526.
4. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation // Microbial Resources (ed. Kurtboke I.). – Elsevier, 2017. – P. 121–148.
5. Grishko V.V., Tarasova E.V., Ivshina I.B. Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of the actinobacterium *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 // Process Biochem. – 2013. – V. 48. – P. 1640–1644.

6. Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B. Cell adaptations of *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66 to betulin biotransformation // Process Biochem. – 2017. – V. 52. – P. 1–9.
7. Huang D., Ding Y., Li Y., Zhang W., Fang W., Chen X. Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid // Cancer Lett. – 2006. – V. 233. – P. 289–296.
8. Funari C.S., de Almeida L., Passalacqua T.G., Martinez I., Ambrosio D.L., Cicarelli R.M.B., Silva D.H.S., Graminha M.A.S. Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong *in vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activity // Acta Amaz. – 2016. – V. 46. – P. 411–416.
9. Ludwig B., Geib D., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Muffler K., Ulber R. Whole-cell biotransformation of oleanolic acid by free and immobilized cells of *Nocardia iowensis*: Characterization of new metabolites // Eng. Life Sci. – 2015. – V. 15. – P. 108–115.
10. Choudhary M.I., Siddiqui Z.A., Nawaz S.A. Microbial transformation of 18 β -glycyrrhetic acid by *Cunninghamella elegans* and *Fusarium lini*, and lipoxygenase inhibitory activity of transformed products // Nat. Prod. Res. – 2009. – V. 23. – P. 507–513.

НОВЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА *SALINISPHAERACEAE* ИЗ СОЛЯНОЙ ШАХТЫ ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ

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

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: Верхнекамское месторождение калийно-магниевых солей, галофильные бактерии, семейство *Salinisphaeraceae*.

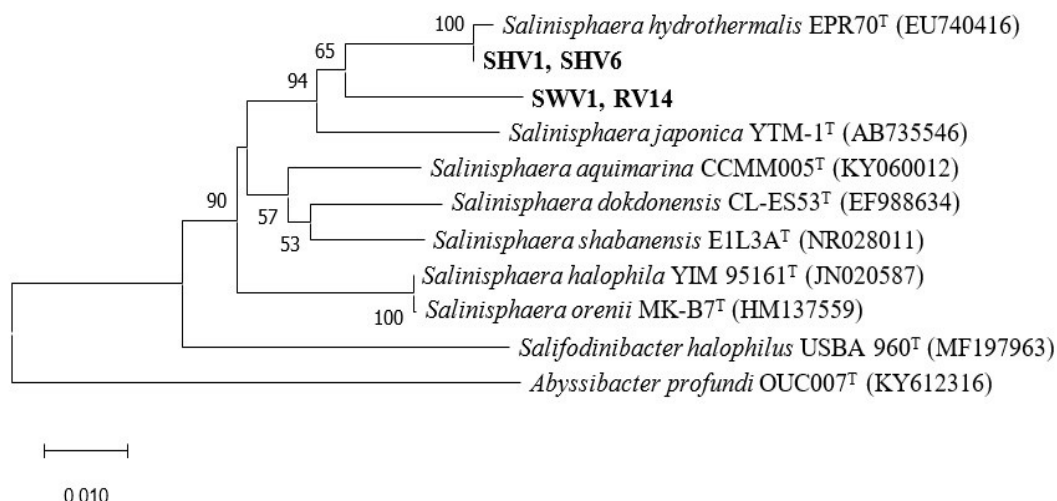
В настоящее время галофильные микроорганизмы являются приоритетным объектом исследований ввиду их способности адаптироваться к широкому диапазону солености и местообитаний на основе различных механизмов приспособления к солевому стрессу [1]. Среди галофильных бактерий описаны деструкторы углеводородных загрязнителей, что свидетельствует о возможности использования данных микроорганизмов для биоремедиации загрязненных объектов окружающей среды [2].

Бактерии семейства *Salinisphaeraceae* (класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Nevskiales*) являются гетеротрофными, галотолерантными или галофильными грамотрицательными бактериями, способны существовать при концентрации NaCl от 10 до 300 г/л [3–11]. Семейство включает три рода: *Salinisphaera*, *Abyssibacter* и *Salifodinibacter*. Представители семейства были обнаружены в средах с высоким содержанием соли, в морских или океанических средах: глубоководном рассоле [3], глубоководных гидротермальных источниках [4], морской воде [5, 6], солончаках [7], воде из бассейна для добычи соли [8], глубоководной рыбе [9] и морской воде из Марианской впадины [10]. В ходе исследования глинистых отложений ВКМКС, отобранных непосредственно в шахтах, было выделено четыре штамма галофильных микроорганизмов, обозначенных SHV1, SHV6, SWV1, RV14. Анализ последовательностей гена 16S рНК показал, что все выделенные бактерии принадлежат семейству *Salinisphaeraceae*.

Цель исследования – проведение сравнительной характеристики новых бактерий, выделенных из соляной шахты ВКМКС, с ранее описанными представителями семейства *Salinisphaeraceae*. Бактериальные штаммы SWV1, RV14 имели сходство по гену 16S рНК с ближайшим типовым штаммом *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T на уровне 95,94% и 96,63%, соответственно. Данные низкие проценты сходства позволяют сделать вывод о том, что эти штаммы представляют собой новый таксон. Штаммы SHV1, SHV6 имели сходство по гену 16S рНК с ближайшим типовым штаммом *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T на уровне 99,89%.

Для определения эволюционного положения выделенных микроорганизмов было построено филогенетическое дерево с использованием метода neighbor-joining, основанное на сравнении с последовательностями гена 16S рНК представителей семейства *Salinisphaeraceae*. Исследуемые штаммы SWV1, RV14 образуют на нем отдельную ветвь, что дополнительно позволяет говорить о них, как о новых таксономических единицах (рис.).

Морфологически все пять исследуемых штаммов были сходны между собой. Клетки граммотрицательные, однообразные, имеют форму палочек, расположены по одиночке. Колонии при росте на богатой среде Раймонда округлые, блестящие, непрозрачные, желтоватого цвета, размером 1-1,5 мм, с ровным краем, гладкой поверхностью с концентрическими кругами, выпуклым профилем и однородной структурой. Некоторые морфологические и физиологические характеристики штаммов семейства *Salinisphaeraceae* приведены в таблице.



Филогенетическое дерево семейства *Salinisphaeraceae*.
Исследуемые штаммы выделены жирным шрифтом

Сравнение новых бактерий семейства *Salinisphaeraceae* с ранее описанными типовыми штаммами родов *Salinisphaera*, *Abyssibacter* и *Salifodinibacter*

Штаммы	Температурные пределы (оптимальная температура роста) (°C)	Предельные (оптимальные) значения pH	Предельные (оптимальные) концентрации NaCl (г/л)	Форма клетки
SHV1, SHV6	28-40 (28)	6.0–7.0 (6.0)	30–270 (70)	Палочки
SWV1, RV14	28-40 (28)	6.0–7.0 (6.0)	30–300 (70)	Палочки
<i>Salinisphaera dokdonensis</i> CL-ES53 ^T	5–40 (25)	5.2–8.8 (6.3–7.2)	40–210 (100)	Палочки
<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T	30–35	5.5 / 5.0–7.5	10–250 (25)	Палочки
<i>Salinisphaera shabanensis</i> E1L3A ^{T*}	5–42 (30–37)	4.0–8.0 (6.5–7.5)	10–280 (100)	Кокки
<i>Salinisphaera japonica</i> YTM-1 ^T	30	5.0–9.0 (7.0)	10–180 (40)	Палочки
<i>Salinisphaera halophila</i> YIM 95161 ^T	15–40 (25–30)	5.0–8.0 (7.0)	60–290(140–190)	Палочки
<i>Salifodinibacter halophilus</i> USBA 960 ^{T*}	20–35 (30)	6.0–7.5 (7.0)	160–350	Кокки и палочки
<i>Abyssibacter profundus</i> OUC007 ^{T*}	10–45 (37)	7.0–9.0 (7.0–8.0)	0–70 (20–30)	Палочки
<i>Salinisphaera aquimarina</i> CCMM005 ^T	0–37 (30)	5.0–9.0 (7.0)	10–180 (40)	Палочки
<i>Salinisphaera orenii</i> MK-B5 ^T	10–40 (35–37)	5.0–8.5 (7–7.5)	30–250 (150–170)	Палочки

*Типовой вид рода

Форма клеток исследуемых штаммов соответствует палочкам, данная форма преобладает у представителей семейства *Salinisphaeraceae*. Также выделенные штаммы являются галофильными бактериями, имеют широкие границы устойчивости к высоким концентрациям соли (10-300 г/л). Условия pH, а также температурные пределы не отличаются особыми показателями от характерных для штаммов семейства.

Ближайший типовой штамм *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T способен использовать додекан в качестве единственного источника углерода и энергии [4]. Была проверена способность исследуемых штаммов расти на дизельном топливе (содержащем n-алканы) как субстрате. Также проведен скрининг штаммов на наличие генов алкан-гидроксилазы (*alkB* и *alkM*) с использованием праймеров TS2S и Deg1RE [12]. Установлено, что рост на дизельном топливе и гены алкангидроксилазы у исследуемых штаммов отсутствовали.

Таким образом, проведена сравнительная характеристика исследуемых штаммов бактерий, выделенных из соляной шахты ВМКМС, с ранее описанными представителями семейства *Salinisphaeraceae*. Выявлены штаммы, которые могут представлять новые таксономические единицы, исследование их будет продолжено.

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

Список цитируемой литературы

1. Kunte H., Lentzen G., Galinski E. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products // Curr Biotechnol. – 2014. – V. 3. – P. 10–25.
2. Плотникова Е.Г., Ястребова О.В., Кошелева И.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Гавриш Е.Ю., Демаков В.А., Боронин А.М. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработок // Микробиология. – 2001. – Т. 70, – № 1. – С. 61–69.
3. Antunes A., Eder W., Fareleira P., Santos H., Huber R. *Salinisphaera shabanensis* gen. nov., sp. nov., a novel, moderately halophilic bacterium from the brine-seawater interface of the Shaban deep, red sea // Extremophiles. – 2003. – V. 7. – P. 29–34.
4. Crespo-Medina M., Chatziefthimiou A., Cruz-Matos R., Pérez-Rodríguez I., Barkay T., Lutz R.A., Starovoytov V., Vetriani C. *Salinisphaera hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic, halotolerant, facultatively autotrophic, thiosulfate-oxidizing gammaproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents, and emended description of the genus *Salinisphaera* // IJSEM. – 2009. – V. 59. – P. 1497–1503.
5. Bae G.D., Hwang C.Y., Kim H.M., Cho B.C., Chung Y.H. *Salinisphaera dokdonensis* sp. nov., isolated from surface seawater // IJSEM. – 2010 – V. 60. – P. 680–685.
6. Tang L., Zhang Z., Xie R., Jiao N., Zhang Y. *Salinisphaera aquimarina* sp. nov., isolated from seawater // IJSEM. – 2018. – V. 68. – P. 1130–1134.
7. Zhang Y.J., Tang S.-K., Shi R., Klenk H.-P., Chen C., Yang L.-L., Zhou Y., Li W.-J. *Salinisphaera halophila* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from brine of a salt well // IJSEM. – 2012 – V. 62. – P. 2174–2179.
8. Park S.J., Cha I.-T., Kim S.-J., Shin K.-S., Hong Y.S., Roh D.-H., Rhee S.-K. *Salinisphaera orenii* sp. nov., isolated from a solar saltern IJSEM. – 2012. – V. 62. – P. 1877–1883.
9. Shimane Y., Tsuruwaka Y., Miyazaki M., Mori K., Minegishi H., Echigo A., Ohta Y., Maruyama T., Grant W.D., Hatada Y. *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* // IJSEM. – 2013. – V. 63. – P. 2180–2185.
10. Zhou S., Ren Q., Li Y., Liu J., Wang X., Wu Y., Zhang Y., Zhang X.-H. *Abyssibacter profundus* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater of the Mariana Trench // IJSEM. – 2018. – V. 68. – P. 3424–3429.
11. Kelly S.A., Megaw J., Gilmore B.F. Draft genome sequence of *Salinisphaera* sp. strain KSM-18, an obligately halophilic bacterium isolated from a Triassic salt mine // Cameron Thrash J. Microbiol. Resour. Announc. – 2018. – V. 7. – P. 1–2.

12. Smits T.H.M., Roethlisberger M., Witholt B., van Beilen J.B. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains // Environmental Microbiology. – 1999. – V. 1(4). – P. 307–317.

РОЛЬ КАДАВЕРИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО СИНТЕЗА ПРИ АДАПТАЦИИ *ESCHERICHIA COLI* К ПЕРОКСИДНОМУ ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

Ахова А.В.^{1,2}, Ткаченко А.Г.^{1,2}

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

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: полиамины, лизиндекарбоксилаза, пероксид водорода, кадаверин

Биогенные полиамины (путресцин, кадаверин, спермидин) вовлечены в адаптивные механизмы, позволяющие бактериальным клеткам преодолевать действие неблагоприятных факторов среды, в том числе вызывающих развитие окислительного стресса [1]. Окислительный стресс может быть инициирован воздействием редокс-активных соединений, таких как редокс-циклирующие соединения и активные формы кислорода и азота, ультрафиолетового и ионизирующего излучений, а также сопровождать действие антибактериальных препаратов, повышенных температур, гиперосмотического сдвига и других [2, 3]. Одной из активных форм кислорода является пероксид водорода, нашедший применение в качестве антисептического средства. В естественных местах обитания бактерии также могут подвергаться действию пероксида водорода и испытывать пероксидный окислительный стресс. Источником пероксида водорода в природных условиях могут служить другие микроорганизмы, например, лактобактерии, и клетки иммунной системы макроорганизма [3]. Установлено, что в ответ на воздействие пероксида водорода в бактериальных клетках происходит активация ферментов синтеза полиаминов и накопление данных поликатионов [4]. Если защитное действие путресцина и спермидина, включая опосредующие его механизмы, изучено достаточно подробно, то вклад кадаверина в выживаемость бактериальных клеток в условиях пероксидного окислительного стресса остается не ясным. Кроме того, неизвестно, каким образом осуществляется регуляция активности системы синтеза кадаверина в данных условиях. Показано, что ферменты синтеза кадаверина, лизиндекарбоксилазы, у *Escherichia coli* представлены двумя изоформами, конститутивной LdcC и индуцибельной CadA [5].

Целью исследования является изучение экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина, в ответ на воздействие пероксида водорода и роль данного полиамина в адаптации *E. coli* к пероксидному окислительному стрессу.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись штаммы *E. coli*: BW25141 (F-, $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, $\Delta(phoB-phoR)580$, λ -, $galU95$, $\Delta uidA3::pir+$, $recA1$, $endA9(\text{del-ins})::FRT$, $rph-1$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, $hsdR514$) способный синтезировать кадаверин и изогенный ему штамм с делецией генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина (BW25141, но $\Delta ldcC\Delta cadA$); SHT40 (GC4468, но $\lambda RS45 ldcC::lacZ$); SHT45 (GC4468, но $\lambda RS45 cadA::lacZ$). Клетки культивировали в 30 мл бульона LB (Amresco, США) при 37 °C без перемешивания. Пероксид водорода вносили по достижении бактериальной культурой оптической плотности 0,3 (при длине волны 600 нм). Для получения клеток с разным содержанием кадаверина микроорганизмы культивировали на декарбоксилазном бульоне с добавкой 10 г/л лизина и без. После 18-20 ч культивирования клетки осаждали центрифугированием (2 мин, 16000 g), отмывали физраствором и ресуспендировали в свежем декарбоксилазном бульоне, доводя до одинаковой плотности.

Полученные культуры подвергали воздействию пероксида водорода. Внутриклеточную концентрацию кадаверина определяли до добавки пероксида. Количественный анализ кадаверина проводили методом ТСХ его дансил-производного [6]. Уровень экспрессии генов оценивали по активности β -галактозидазы в клетках, несущих слияние промотора исследуемого гена со структурной частью *lacZ*. Активность в клеточных экстрактах, полученных в результате обработки клеток смесью додецилсульфата натрия и хлороформа, определяли по скорости разложения орто-нитрофенил- β -D-галактопиранозид [7].

Жизнеспособность (выживаемость) клеток оценивали по изменению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в культуре, подвергнутой воздействию пероксида водорода. Количество КОЕ определяли методом посева последовательных разведений бактериальной культуры в физрастворе на поверхность агара LB в чашках Петри. Количество КОЕ подсчитывали после 20 ч инкубации при 37 °C.

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что воздействие пероксида водорода вызывает повышение лизиндекарбоксилазной активности и последующее накопление кадаверина в клетках *E. coli*. Это может быть обусловлено как увеличением собственно каталитической активности белков, так и повышением уровня экспрессии кодирующих их генов. С использованием генных слияний мы исследовали уровень экспрессии генов *cadA* и *ldcC* в клетках *E. coli*, подвергнутых воздействию различных концентраций пероксида водорода. Были выбраны концентрации, добавка которых не оказывала влияния на рост периодической культуры (субингибиторные концентрации, 0,1 мМ), снижала скорость роста, но не оказывала влияния на количество КОЕ (ингибиторные концентрации, 0,5-1 мМ), вызвала снижение количества КОЕ по сравнению с нестрессированной культурой, но не ниже уровня, наблюдаемого при добавке стрессора (сублетальные концентрации, 2-3 мМ), приводила к гибели клеток (КОЕ/мл $<10^3$) (летальные дозы, 6 мМ). Выбранные дозы пероксида водорода были способны вызывать в бактериальных клетках развитие окислительного стресса, о чем свидетельствовала активация экспрессии генов, входящих в OxyR-регулон защиты от пероксидного окислительного стресса [8]. В частности, добавка 0,1-1 мМ пероксида водорода вызывала повышение экспрессии гена *katG* по принципу доза-эффект. Экспрессия данного антиоксидантного гена повышалась в клетках, подвергнутых действию 3 и 6 мМ пероксида, но стимулирующий эффект был ниже, чем в случае воздействия более низких концентраций оксиданта. Пероксид водорода в концентрации 0,5-3 мМ вызывал дозозависимое повышение экспрессии генов *ldcC* и *cadA*, добавка 6 мМ оксиданта снижала экспрессию до уровня ниже контрольного. Если для повышения уровня экспрессии *katG* в 2 раза было достаточно 0,1-0,5 мМ пероксида водорода, то для аналогичного эффекта на уровень экспрессии генов, кодирующих лизиндекарбоксилазы, было необходимо 3 мМ оксиданта. Кроме того, если активация экспрессии *katG* наблюдалась уже в первые моменты после добавки пероксида, то повышение экспрессии генов синтеза кадаверина происходило через час после начала воздействия. Из чего можно заключить, что гены *ldcC* и *cadA* не входят в состав OxyR-регулона, но участвуют в ответе на пероксидный окислительный стресс.

Далее была дана оценка вклада накопления кадаверина в адаптацию бактерий к пероксидному окислительному стрессу. С этой целью сравнили выживаемость клеток способных синтезировать кадаверин и неспособных к синтезу данного полиамина (за счет делеции лизиндекарбоксилазы), подвергнутых воздействию разных доз пероксида водорода (0,5-6 мМ) в течение одного часа. При данной постановке эксперимента различий в чувствительности к пероксиду водорода кадаверин-дефицитного штамма и штамма дикого типа выявлено не было. Также мы оценили влияние уровня внутриклеточного эндогенного кадаверина на чувствительность бактерий к пероксиду водорода. Для этого описанным выше способом получили бактериальные клетки, отличающиеся примерно в два раза по содержанию кадаверина, и подвергли их одинаковому по силе пероксидному стрессу. В первый час воздействия пероксида выживаемость клеток с более высоким уровнем эндогенного кадаверина была на порядок выше, в дальнейшем скорость отмирания культур была одинакова и не зависела от начального уровня внутриклеточного кадаверина.

Таким образом, в ответ на воздействие пероксида водорода в клетках *E. coli* возрастает уровень экспрессии генов *ldcC* и *cadA*, кодирующих ферменты синтеза кадаверина (лизиндекарбоксилазы). При адаптации к пероксидному окислительному стрессу значение имеет не столько способность декарбоксилировать лизин, сколько уровень внутриклеточного кадаверина в момент начала воздействия оксиданта.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (AAAA-A19-119112290009-1)

Список цитируемой литературы

1. 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.
2. Imlay J.A. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think // Curr. Opin. Microbiol. – 2015. – V. 24. – P. 124–131.
3. Imlay J.A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? // Environ. Microbiol. – 2019. – V. 21. – № 2. – P. 521–530.
4. Tkachenko A.G., Nesterova L.Y. Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli* // Biochemistry (Mosc). – 2003. – V. 68. – № 8. – P. 850-6.
5. Ma W., Chen K., Li Y., Hao N., Wang X., Ouyang P. Advances in cadaverine bacterial production and its applications // Engineering. – 2017. – V. 3. – № 3. – 308-317.
6. 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.
7. Miller J.H. Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1972.
8. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96. – P. 6161-65.

ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ НА БИОПЛЕНКИ РОДОКОККОВ

Баяндина Е.А.¹, Глебов Г.Г.^{1,2}, Куюкина М.С.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: биопленки, родококки, оксид меди

Формирование биопленок можно рассматривать как способ роста бактерий, который обеспечивает защиту клеток от воздействия негативных факторов окружающей среды [1]. К данным факторам можно отнести наночастицы (НЧ), физико-химические характеристики которых (размер, форма, поверхностный заряд, гидрофобность и функциональные группы), определяют их взаимодействие с компонентами биопленок, в частности влияние на морфометрические и упруго-механические свойства клеток [2]. Актинобактерии рода *Rhodococcus* перспективны для биоремедиации загрязненных экосистем ввиду их способности утилизировать сложные органические загрязнители, такие как углеводороды нефти, пестициды и другие ксенобиотики [3]. Метод комбинированной атомно-силовой и конфокальной лазерной микроскопии (АСМ-КЛСМ) используется при изучении морфометрических и упруго-механических характеристик как целостной биопленки, так и ее отдельных клеток, которые способны адаптироваться к воздействию неблагоприятных факторов.

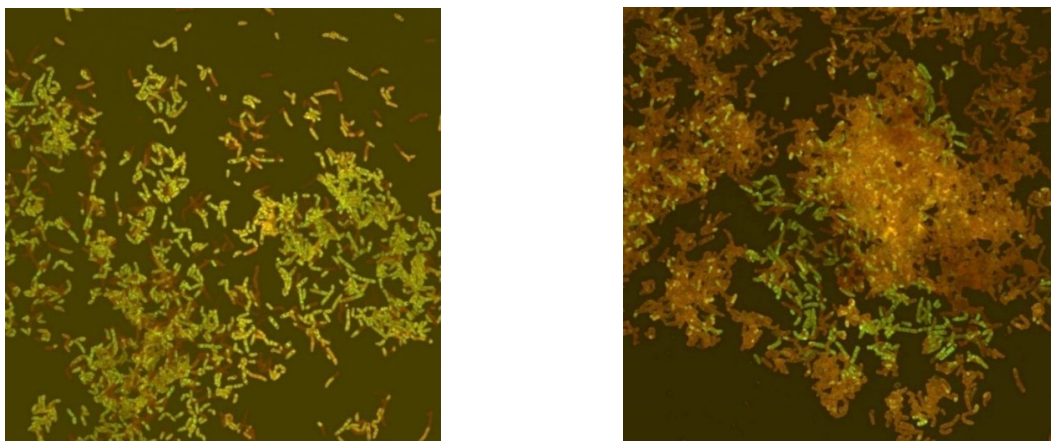


Рисунок 1 – КЛСМ-изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, инкубированных 72 ч без НЧ CuO (А) и в присутствии 0,01 г/л НЧ CuO (В)

Это особо важно для понимания влияния НЧ металлов, воздействующих на микроорганизмы в процессе их жизнедеятельности в биопленках. Цель работы – изучение влияния наночастиц оксида меди на клетки биопленки родококков. В работе использовали штаммы *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 и *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 1363 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ; WFCC #768; www.iegml.ru/iegmlcol/index.html). Культивирование биопленок на покровных стеклах осуществляли в 50 мл среды МПБ в конических колбах объемом 150 мл при постоянном перемешивании (100 об/мин), температуре 28 °С в течение 24 ч. НЧ оксида меди в форме порошка (ООО «Эквилибриум», г. Саранск) обрабатывали с помощью ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 (MSE, Великобритания) в фосфатном буфере, готовили в десятикратных концентрациях (0,01-0,1 г/л), добавляли в колбы со средой МПБ, содержащей 24-ч биопленки и культивировали в динамических условиях в течение 24 и 48 ч. Покровное стекло с выращенным монослоем биопленки сушили на воздухе в течение 10-15 мин затем добавляли флуоресцентный краситель LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, США) и оставляли в темном месте на 20 мин. Препарат промывали деионизированной водой для удаления остатков красителя, планктонных клеток и среды. До получения топографического изображения на воздухе производили КЛСМ-сканирование на микроскопе FluoView 1000 (Olympus, Япония) с использованием иммерсионного объектива ($\times 100$, числовая апертура 1,4). АСМ-сканирование клеток проводили в полуконтактном режиме на воздухе при помощи микроскопа MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) с использованием кремниевого кантилевера AC240TS с резонансной частотой 50–90 кГц и константой жесткости 0,5–4,4 Н/м. Скорость сканирования образцов составляла 0,5 линии/с. Обработку морфометрических показателей и расчёт шероховатости клеточной стенки осуществляли в программе IGOR Pro 6.37 (WaveMetrics, США).

Как видно на рис. 1, после 24 ч культивирования в полноценной питательной среде (МПБ) на покровном стекле наблюдался монослой адгезированных клеток родококков. Добавление НЧ CuO к формирующейся биопленке приводило к существенному повышению степени агрегации клеток по сравнению с контролем. Увеличение концентрации НЧ CuO до 0,1 г/л приводило к снижению на 80-100% числа жизнеспособных родококков. При этом увеличение времени экспозиции с повышенными концентрациями НЧ CuO усиливало их токсический эффект в отношении клеток обоих штаммов. Однако, даже при максимальной (0,1 г/л) концентрации НЧ CuO жизнеспособность клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1363 оставалась в 5 раз выше по сравнению с таковой *R. ruber* ИЭГМ 231.

По нашим данным, жизнеспособные контрольные клетки *R. ruber* ИЭГМ 231 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 1363 характеризовались относительно гладким рельефом и вытянутой палочковидной формой с шероховатостью 107 ± 5 и 133 ± 12 нм соответственно (рис. 2, 3). Через 24 ч после внесения НЧ оксида меди в среду МПБ с выращенной на покровном стекле

био пленкой наблюдалось повышение шероховатости клеточной стенки – до 128 ± 5 нм для *R. ruber* и 229 ± 44 нм для *R. rhodochrous* (табл.). Следует отметить, что шероховатость контрольных клеток (без добавления НЧ CuO) также повышалась в процессе формирования био пленки, свидетельствуя о важном значении клеточного рельефа в процессах колонизации твердых поверхностей и адаптации родококков к негативным физико-химическим воздействиям [4].

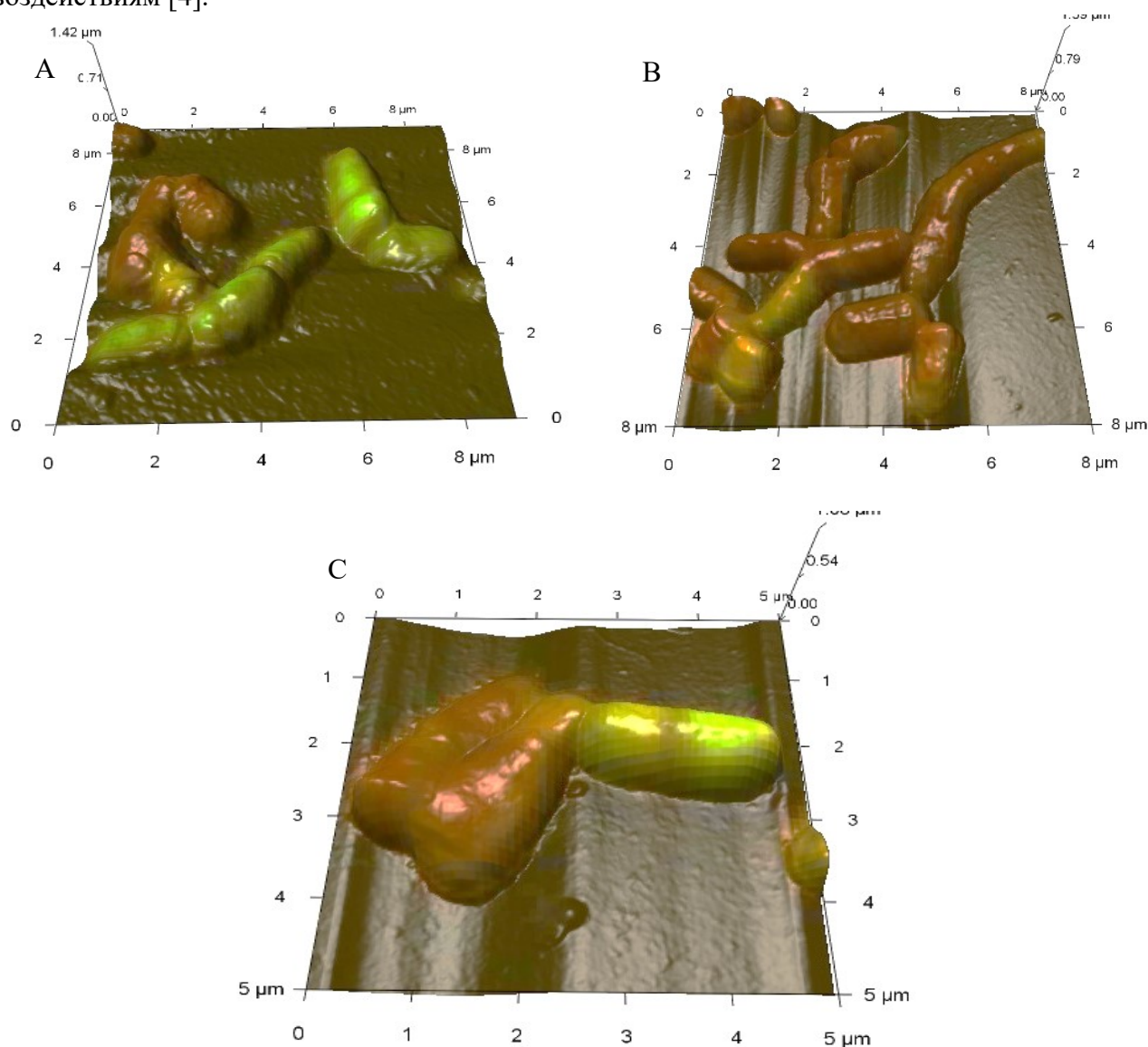


Рисунок 2 – Комбинированные КЛСМ-АСМ изображения клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, инкубированных 48 ч. без НЧ CuO (А), в присутствии 0,1 г/л (В) и 0,01 г/л CuO (С)

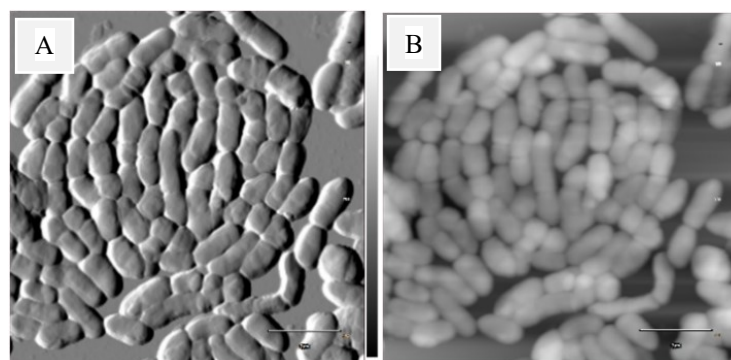


Рисунок 3 – АСМ-изображения контрольных клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 1363 на покровном стекле (без добавления НЧ CuO) на канале амплитуды (А) и высоты (В)

Изменение среднеквадратичной шероховатости клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 *R. Rhodochrous* ИЭГМ 1363 в монослое при инкубировании в присутствии НЧ оксида меди

Время культивирования с НЧ CuO, ч	Контроль	0,01 г/л	0,1 г/л
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231			
24	107 ± 5*	113 ± 7	128 ± 5
	152 ± 18**	162 ± 11	178 ± 15
48	118 ± 16	125 ± 11	147 ± 5
	144 ± 26	174 ± 47	181 ± 39
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1363			
24	133 ± 12	157 ± 2	229 ± 44
	158 ± 13,19	156 ± 3	212 ± 16
48	147 ± 15	199 ± 29	268 ± 26
	186 ± 23	206 ± 21	248 ± 30

Примечание: *живые клетки, ** мертвые клетки

Таким образом, в результате исследования показано, что НЧ оксида меди в двух исследуемых концентрациях (0,01 и 0,1 г/л) проявляли сильный антибактериальный эффект в отношении родококков. При этом форма и размеры жизнеспособных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 1363, формирующих монослой на поверхности покровного стекла, существенно изменялись, а шероховатость клеточной стенки возрастала на 30-40%.

Исследования выполнены в рамках госзаданий (AAAAA19-119112290010-4, AAAAA20-120081990069-3) и поддержаны грантом РНФ 18-14-00140.

Список цитируемой литературы

1. Feng J. Chemical, physical and morphological properties of bacterial biofilms affect survival of encased *Campylobacter jejuni* F38011 under aerobic stress / Feng J. [et al.] // International Journal of Food Microbiology, 2016. Vol. 238, P. 172–182.
2. Fulaz. S. Nanoparticle-Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix / Fulaz. S 1, Vitale S 1, Quinn L. 1, Casey E // Trends in Microbiology, 2019. Vol. 27(11), P. 915-926.
3. Martínková L Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / Martínková L, Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. // Environment International, 2009. Vol. 5, P. 162–177.
4. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Tyumina E.A. Response mechanisms to ecopollutants and pathogenization risks of saprotrophic *Rhodococcus* // Pathogens. 2021. Vol. 10, Iss. 974.

ВЫХОД СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ ГЛАДИОЛУСА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Белоногова А.Г.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: выход стерильной культуры, жизнеспособность, *Gladiolus murieale* Kelway, *Gladiolus dalenii* Van Geel, *Gladiolus* × *hybridus* hort.

Представлены результаты исследований по выходу стерильной культуры и жизнеспособности эксплантов трёх видов рода *Gladiolus* L.: *Gladiolus murieale* Kelway, *Gladiolus dalenii* Van Geel и *Gladiolus* × *hybridus* hort.

Установлено, что для стерилизации эксплантов *Gladiolus* L. оптимальным является следующий порядок стерилизующих агентов: раствор нейтрального детергента в течение 30 мин, промывка проточной водой в течение 10 мин., раствор гипохлорита натрия в течение 20 мин и 96% этанол в течение 30 сек. Выход стерильной культуры для исследованных видов составил 80%. На этапе микроразмножения высокие результаты получены при добавлении к питательной среде Мурасиге и Скуга 1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП, а также без добавления витаминов и фитогормонов. Показатель жизнеспособности исследованных видов составляет 100%. Гладиолус является одной из распространенных декоративных цветочных культур. Активная селекционная работа с данным растением ведется более ста лет, и интерес к нему неизменно растет [1]. Ускорить селекционный процесс помогают методы микроклонального размножения, которые позволяют получить свободный от вирусов посадочный материал за небольшой период времени в достаточном количестве [2]. Важным этапом микроклонального размножения является введение в культуру *in vitro*. Высокая эффективность введения в стерильную культуру зависит от многих факторов: режим стерилизации и тип используемых стерилизующих агентов, видовые и сортовые особенности растений, возраст и качество используемых эксплантов [3].

Цель данной работы – определить выход стерильной культуры и жизнеспособность эксплантов трех видов рода *Gladiolus* L: *Gladiolus murieale* Kelway, *Gladiolus dalenii* Van Geel и *Gladiolus* × *hybridus* hort.

Исследования проводились в 2021 г. в лаборатории микроклонального размножения кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета. В качестве первичного экспланта были использованы клубнепочки. Всего было высажено 79 эксплантов вида *Gladiolus murieale*, 76 – вида *Gladiolus dalenii* и 76 – вида *Gladiolus hybridus*. Стерилизацию проводили в три общепринятых этапа. Режимы стерилизации представлены в таблице 1. На этапе введения в культуру *in vitro* экспланты высаживались на питательную среду, имеющую минеральную основу по Т. Murashige и F. Skoog [4]. В среду добавлялись сахароза 20 мг/л и агар 8 мг/л. В среду также вносились витамины: тиамин в концентрации 0,1 мг/л, пиридоксин и никотиновая кислота – по 0,5 мг/л, и фитогормоны: индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрациях 2 и 0,2 мг/л и цитокинин – 6-бензиламинопурин (6-БАП) – 0,5 мг/л. В исследовании использовалось 4 варианта среды, отличающихся соотношением витаминов и фитогормонов (табл. 2).

Таблица 1 – Режимы стерилизации эксплантов гладиолуса

Режим стерилизации	Этапы		
	Престерилизация	Стерилизация	Постстерилизация
1	Раствор нейтрального детергента (стиральный порошок) 30 мин, промывка проточной водой 10 мин	Раствор гипохлорита натрия ("Белизна") 20 мин, 96% этанол 30 сек	Промывка стерилизованной дистиллированной водой, три смены по 5 мин в каждой
2	Раствор нейтрального детергента (стиральный порошок) 40 мин, промывка проточной водой 10 мин	Раствор гипохлорита натрия (белизна) 15 мин, 96% этанол 30 сек	

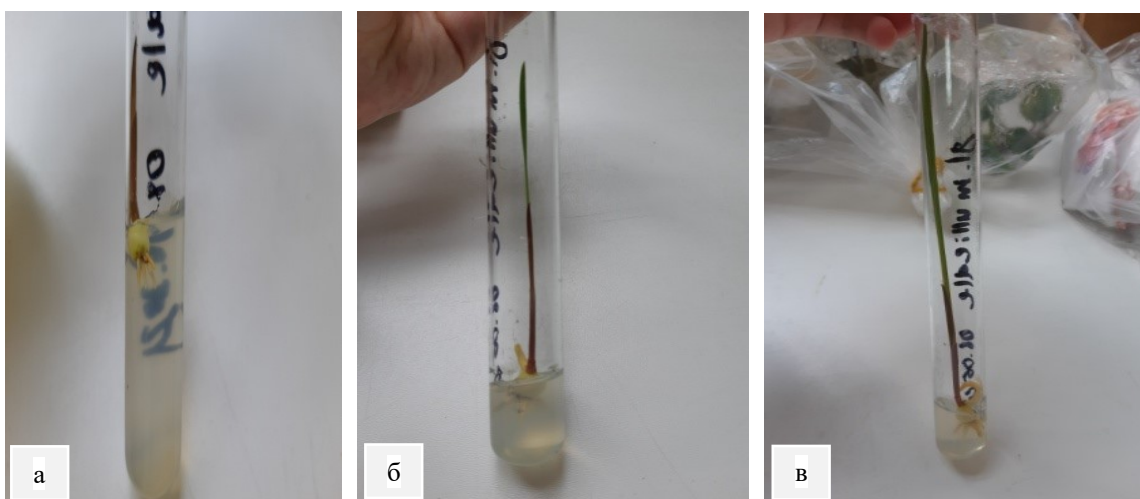
Стерилизация питательной среды в пробирках проводилась в автоклаве при температуре 120°C, при давлении 1 атм. в течение 15 мин. Все этапы микроразмножения проводились в стерильных условиях в ламинар-боксе.

Таблица 2 – Варианты питательной среды Мурасиге и Скуга для микрোকлонального размножения гладиолуса

Вариант среды	Витамины, мг/л	Фитогормоны	
		Ауксины, мг/л	Цитокинины, мг/л
1	+	ИУК – 0,5	БАП – 0,25
2	+	ИУК – 0,5	–
3	+	ИУК – 0,1	–
4	–	–	–

Примечание: прочерк означает отсутствие в среде витамина и/или фитогормона

Микрোকлональное размножение гладиолуса проводилось в четыре этапа, выделение которых является общепринятым. Определяющую роль на первом этапе играет выход стерильной культуры. Наиболее высокий процент выхода стерильной культуры получен при использовании в качестве основного стерилизующего агента раствора гипохлорита натрия "Белизна" в течение 20 мин. Он составил 80%. Наименее эффективным вариантом оказалось использование раствора гипохлорита натрия "Белизна" в течение 15 мин. В этом случае выход стерильной культуры составил 60%. Данные показатели являются средними по всем исследованным видам. Прорастание клубнепочек начинается через 7 дней после посадки (рис.).



Развитие эксплантов *Gladiolus murieale* Kelway на питательной среде Мурасиге и Скуга: а – через 1 неделю после посадки; б – через 2 недели после посадки; в – через 3 недели после посадки

Наиболее высокая жизнеспособность клубнепочек отмечается на варианте среды Мурасиге и Скуга с добавлением 1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП и на варианте – без добавления витаминов и фитогормонов. Данный показатель составил 100% для всех исследованных видов.

Таким образом, для получения хорошо растущей стерильной культуры исследуемых видов гладиолуса рекомендуется использовать раствор нейтрального детергента в течение 30 мин, промывку проточной водой в течение 10 мин, раствор гипохлорита натрия в течение 20 мин и 96% этанол в течение 30 сек. На этапе микроразмножения рекомендуется использовать варианты твердой питательной среды MS с добавлением 1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП, а также без добавления витаминов и фитогормонов.

Список цитируемой литературы

1. Шибанова Н. Л., Черткова М. А., Чемарова Т. Д. Микроклональное размножение *Gladiolus* × *hybridus* сорта "Пермский сувенир" селекции учебного ботанического сада ПГНИУ// Вестник Пермского университета. – 2020. – Вып. 2. – С. 97–102.
2. Самарская В. О., Малаева Е. В., Постнова М. В. Аспекты клонального микроразмножения и сохранения растений *in vitro*// Природные системы и ресурсы. – 2019. – Т.9. – №3. – С. 13–22.
3. Никитина А. В., Леконцева Т. Г., Федоров А. В., Ленточкин А. М. Влияние способа стерилизации и срока введения в культуру *in vitro* на жизнеспособность эксплантов клонового подвоя яблони 54-118// Вестник Удмуртского университета. – 2020. – Т. 30. – Вып. 4. – С. 411–415.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15(3). – P. 490.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА

Бельтюкова Н.Н.¹, Султангазина Г.Ж.², Бейшова И.С.³, Ульянов В.А.², Бейшов Р.С.²

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова, Костанай, Казахстан

³НАО «Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана»,
Уральск, Казахстан

Ключевые слова: Северный Казахстан, частота аллелей, ценопопуляция

Pulsatilla flavescens (Zucc.) Juz. – прострел желтеющий и *Adonis wolgensis* Stev. – адонис волжский являются редкими видами Республики Казахстан, они занесены в Красную книгу Казахстана [1]. Лимитирующими факторами этих видов является хозяйственная деятельность человека (распашка земель, выпас скота), сбор цветущих растений на букеты [2]. В настоящее время для сохранения генофондов редких видов растений активно используются молекулярно-генетические методы, основанные на анализе количественных характеристик генетического разнообразия популяций [3].

Целью данной работы является проведение молекулярно-генетического анализа десяти ценопопуляций, расположенных на территории Костанайской области около села Щербаково (Pf1), села Озерное (Pf2) и на территории Акмолинской области около села Макинка (Pf3), села Катарколь (Pf4) и Золотоборского лесничества (Pf5) Северного Казахстана. Для анализа генетического полиморфизма был применен метод межмикросателлитного анализа (ISSR – Inter Simple Sequence Repeats) [4] с использованием пяти эффективных праймеров, выявленных ранее (ISSR1 – (AC)₈T, ISSR3 – (TG)₈AA, M1 – (AC)₈CG, X11 – (AGC)₆G, M27 – (GA)₈AC) [5].

В пяти ценопопуляциях *P. flavescens* было выявлено 146 ISSR-PCR маркеров, среди которых 132 оказались полиморфными ($P_{95}=0,904$). В суммарной выборке число амплифицированных ISSR-PCR маркеров варьировало в зависимости от ISSR-праймера от 23 (ISSR3) до 37 (ISSR1). Число полиморфных фрагментов ДНК в суммарной выборке растений варьировало от 23 до 31, а их размеры – от 180 до 1500 пн.

Доля полиморфных локусов в общей выборке *P. flavescens* в зависимости от ISSR-праймера колебалась от 0,857 (X11) до 1,000 (M27, ISSR3) и в среднем составила 0,904.

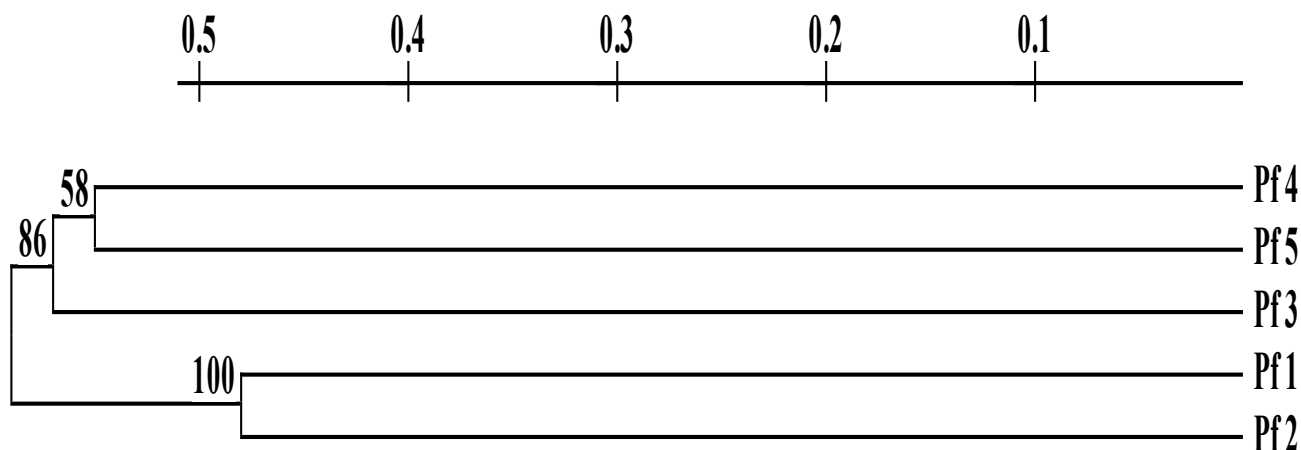
Ожидаемая гетерозиготность (H_E) по локусам в общей выборке *P. flavescens* составила 0,204. В ценопопуляциях эта величина варьировала от 0,165 в Pf2 до 0,245 в Pf5.

Абсолютное и эффективное число аллелей на локус (n_a) на общую выборку составило 1,238 и 1,345, соответственно. Эти параметры имеют высокие значения ($n_a=1,473$, $n_e=1,410$) в пятой ценопопуляции (Pf5), а наименьшие ($n_a=1,062$, $n_e=1,281$) – во второй ценопопуляции (Pf2). Было обнаружено 6 редких фрагментов: три в первой (Pf1), по одному в остальных ценопопуляциях (Pf4, Pf5), за исключением третьей.

Большей равномерностью распределения частот аллелей ($\mu=1,802$) характеризуется пятая ценопопуляция (Pf5), а наименьшей ($\mu=1,730$) – вторая ценопопуляция (Pf2). Наиболее сбалансированной структурой разнообразия характеризуется пятая ценопопуляция (Pf5) с долей редких морф равной 0,099, а наименее сбалансированной ($h=0,135$) – вторая ценопопуляция (Pf2). Информационный Индекс Шеннона также выявил наибольшее разнообразие в пятой ценопопуляции (Pf5) и составил 0,369, а наименьшее – во второй ценопопуляции Pf2 со значением 0,248.

Общее генное разнообразие в суммарной выборке (H_T) *P. flavescens* составило 0,281, среднее генное выборочное разнообразие (H_S) в ценопопуляциях *P. flavescens* равно 0,204. Таким образом, средняя гетерозиготность в ценопопуляциях *P. flavescens* ниже, чем в общей выборке. Наименьшие показатели доли гетерозиготных генотипов выявлены с помощью праймера ISSR-1, определенная им ожидаемая гетерозиготность составляет 0,241, а самые высокие значения этого показателя отмечены у праймера ISSR-3 ($H_S=0,338$). Изученные ценопопуляции *P. flavescens* слабо дифференцированы, наибольшая часть всего наблюдаемого генетического разнообразия сосредоточена внутри популяций 72,7%, а на долю межпопуляционной изменчивости приходится 27,3%.

На основании матрицы бинарных данных невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) построена дендрограмма, отражающая степень сходства исследуемых ценопопуляций по ISSR-спектрам (рисунок).



UPGMA-дендрограмма генетического сходства 5 ценопопуляций *P. flavescens*, построенная на основании полиморфизма ISSR-маркеров; шкала сверху – генетическое расстояние; указаны значения бутстрепа (в %)

Ценопопуляции *P. flavescens* на дендрограмме объединились в кластеры согласно их географическому расположению. Один кластер образовали первая и вторая ценопопуляция в связи с их расположением на территории Костанайской области. Другой кластер образовали остальные изученные ценопопуляции, расположенные на территории Акмолинской области.

В результате амплификации проб ДНК адониса волжского с 15 анализируемыми ISSR-праймерами были получены фрагменты ДНК молекулярным весом от 200 до 1300 н.п. Количество амплифицируемых фрагментов в зависимости от праймера варьировало от 4 (ISSR1) до 20 (M1, M27), 3 праймера не инициировали амплификации с ДНК *A. wolgensis*, либо фрагменты были не воспроизводимыми в повторных исследованиях (X9, ISSR3, ISSR9).

Из 15 проанализированных ISSR-PCR праймеров с тотальной ДНК *A. wolgensis* 5 продемонстрировали высокую эффективность (5), так как выявили наибольшее число четко амплифицирующихся фрагментов ДНК, два праймера обнаружили среднюю (4), остальные праймеры показали невысокую (3 и ниже) эффективность (табл.). Для дальнейшего проведения молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК *A. wolgensis* были отобраны следующие 5 праймеров: M1 – (AC)₈CG, M3 – (AC)₈CT, M27 – (GA)₈C, X11 – (AGC)₆G, ISSR4 – (ACG)₇G.

Таким образом, для молекулярно-генетического анализа популяций *A. wolgensis* с использованием ISSR-PCR маркеров был произведен подбор ISSR-PCR праймеров по эффективности выявления полиморфизма ДНК. Каждый праймер индивидуально был проанализирован в ПЦР с тотальной ДНК исследуемого вида.

На основании проведенного ISSR-анализа генетического полиморфизма пяти ценопопуляций *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz. Северного Казахстана можно заключить, что изученные ценопопуляции этого вида характеризуются высокими показателями генетического разнообразия и низкой генетической подразделенностью ценопопуляций. Самые высокие показатели генетического разнообразия отмечены в ценопопуляции, расположенной в Акмолинской области (Золотоборское лесничество), а самые низкие в ценопопуляциях, расположенных в Костанайской области (Pf1, Pf2).

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», номер государственной регистрации 0118PK00404.

Список цитируемой литературы

1. Красная книга Казахстана. 2-е изд., испр. и доп. Астана: ТОО «АртРпп1XX1», 2014. Т. 2. Растения. 452 с.
2. Гайворон Е. и др. Редкие и исчезающие растения Северо-Казахстанской области // Материалы III Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы науки и образования в области естественных и сельскохозяйственных наук», посвященной 90-летию академика Е.А. Букетова. Т.1., 2015. С. 22-27.
3. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь: Перм. гос. нац. исслед. ун-т., 2013. 239 с.
4. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification // Genomics. 1994. V. 20. № 2. P. 176-183.
5. Шакирова А.Р. Подбор эффективных ISSR-праймеров для редких видов растений *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz. и *Pulsatilla patens* (L.) Mill. // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. Конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием (Пермь, 13–15 мая 2019 г.): Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2019. С. 162-164.

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЖИВОТНЫЙ МИР В РАЙОНЕ РАЗМЕЩЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРЕДПРИЯТИЯ АО «АКТЮБИНСКИЙ ЗАВОД ХРОМОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ» (АО «АЗХС»)

Бородкина М.С.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

Ключевые слова: животный мир, техногенное воздействие, шестивалентный хром, мониторинг.

Территория, окружающая г. Актобе, принадлежит к степной и переходной зоогеографической зоне. Естественная фауна на незатронутых хозяйственной деятельностью территориях ранее насчитывала до 48 видов млекопитающих. В прошлом здесь встречались ценные промысловые виды хищных, копытных и грызунов [6]. В настоящее время на территории, окружающей г. Актобе, возможно обитание около 200 видов позвоночных. Из этого числа фауна водоёмов насчитывает не менее 17 видов рыб, и 3 вида земноводных. Встречается 5 видов пресмыкающихся. В периоды миграции здесь может находиться около 150 видов пернатых, большинство из которых пролётные [1].

Основные виды прямого, техногенного воздействия на фауну, приводящие к устойчивой трансформации фаунистического сообщества это земляные работы, строительство дорог, возведение зданий и иных сооружений, движение автотранспорта [4]. Непосредственное воздействие на животных (мелких хищников, грызунов, наземно-гнездящихся пернатых и пресмыкающихся) проявляется в виде их прямой гибели под колёсами автотранспорта или под воздействием землеройной техники при рытье траншей, котлованов и прочих работах [2].

Проливы ГСМ и нефти, даже незначительные по объёму, являются факторами вызывающим прямую гибель насекомых, некоторых пресмыкающихся, насекомоядных млекопитающих и многих видов пернатых [2]. Попадание отходов производства в поверхностные воды приводит к гибели беспозвоночных, вызывает гибель бентофауны и представителей ихтиофауны. Ухудшается кормовая база околородных пернатых, представителей ихтиофауны [3].

Наиболее значимый фактор воздействия на фауну окружающей завод территории – это возможное накопление в тканях беспозвоночных, рыб, наземных животных и птиц соединений цветных металлов – хрома, никеля, кобальта, мышьяка и сурьмы. В частности, показатели содержания этих металлов в шлаках, одного из основных твердых отходов АЗХС, превышают ПДК [4].

Потенциально опасно для таких организмов как простейшие, беспозвоночные, а также рыбы, земноводные, пернатые и, в конечном счёте, для человека, попадание в грунтовые воды части подаваемой в накопитель жидкой фазы пульпы, имеющей высокую степень минерализации. Опасно для человека и представителей околородной фауны превышение ПДК по содержанию трёх и шести валентного хрома в дренажном водозаборе на промплощадке АО «АЗХС» [4].

Результаты воздействия. Район в течение длительного времени подвергался антропогенному и техногенному воздействию, что вызвало обеднение видового состава герпетофауны и фауны млекопитающих. Наблюдаются уменьшение численности фоновых видов и деградация среды их обитания. Сократились площади пригодные для заселения, произошло снижение уровня воспроизводства [3]. Изменился видовой состав и распределение представителей фауны пресмыкающихся и грызунов. В тоже время в период весны и осени через территорию мигрирует значительное количество пернатых. К настоящему времени в зоне воздействия АО «АЗХС» видовая структура фаунистических комплексов наземных животных в основном сформировалась [2]. К северо-западу от г. Актобе проходит один из путей сезонных миграций пернатых в направлении юго-запад северо-восток.

В рассматриваемом районе, вдоль рек, на естественных и искусственных водоёмах встречаются пернатые водно-болотного комплекса [4]. В тоже время на открытых пространствах, прилегающих к территории завода, обитают мезофильные и степные виды пернатых, в том числе и принадлежащие к полупустынному комплексу видов. В кустарниковых массивах, на дачных и садовых участках в лесополосах и среди древесных насаждений вдоль пойм рек Илека и Женишке обитают дендрофильные (лесные) виды пернатых [2].

В пределах изучаемой территории возможны встречи редких насекомых – в основном чешуекрылых, внесённых в Красную Книгу Казахстана [5]. Мониторинг животного мира в 2018-2019 г. не выявил каких-либо существенных изменений по сравнению с прошлыми годами.

Список цитируемой литературы

1. Мариковский, П. И. Животные Казахстана в фотографиях / П. И. Мариковский, Е. В. Гвоздев. – 2-е издание, переработанное и дополненное. – Алматы: Наука Казахской ССР, 1987. – 208 с.
2. Отчет о научно-исследовательской работе «Производственный мониторинг АО «АЗХС», Алматы, 2018.
3. Отчет ОВОС АО «АЗХС» «Оценка воздействия производства сульфата хрома на окружающую среду» Т.2, «Казмеханобр», Алматы 2018
4. Оценка воздействия цехов производства ОХП-1 АО «АЗХС» на окружающую среду, ГНПОПЭ «Казмеханобр», Алматы 2019
5. Постановление Правительства Республики Казахстан от 31 октября 2006 года N 1034 «Об утверждении Перечней редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных и растений»
6. Формозов, А. Н. Животный мир Казахстана / А. Н. Формозов. – 2-е издание. – Москва: ЛКИ, 2010. – 152 с.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Бочкова М.С.^{1,3}, Ужвиюк С.В.¹, Тимганова В.П.¹, Храмцов П.В.^{1,3}, Шардина К.Ю.¹, Кропанева М.Д.^{1,3}, Нечаев А.И.², Раев М.Б.^{1,3}, Заморина С.А.^{1,3}

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

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

³Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: оксид графена, полиэтиленгликоль, дендритные клетки, жизнеспособность, поглощение

Наночастицы графена и его модификации пользуются популярностью в биомедицинских исследованиях. Активно исследуется потенциал применения оксида графена (ОГ) в качестве биосенсоров, в доставке лекарственных средств, фототермальной терапии, секвенировании ДНК [1]. Не мало важным фактом применения ОГ в живых биологических системах является его биосовместимость с клетками, а в особенности с клетками иммунной системы, поскольку они первыми вступают в контакт с чужеродными объектами. При этом совместимость наночастиц с клетками иммунной системы в значительной степени определяется химическим составом их поверхности, что может приводить к стимуляции и/или подавлению иммунного ответа [2].

© Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Тимганова В.П., Храмцов П.В., Шардина К.Ю., Кропанева М.Д., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А., 2021

Одним из самых распространённых и биосовместимых материалов для функционализации ОГ является полиэтиленгликоль (ПЭГ) [3]. Цель исследования – изучение влияния наночастиц ОГ на функциональную активность и дифференцировку дендритных клеток человека.

Материалы и методы. Исследование проводили в соответствии с Хельсинской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на работу с образцами периферической крови было получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 30.08.2019.

В работе использовались наночастицы ОГ размерами 100-200 нм («малый» ОГм) и 1-5 мкм («большой» ОГб) («Ossila Ltd», Великобритания), которые покрывались линейным и разветвленным ПЭГ (П-ОГ и рП-ОГ, соответственно). Фракционированные моноклеарные клетки периферической крови (МПК) практически здоровых доноров (n=4). МПК получали центрифугированием в градиенте плотности «Диаколл» (1,077 г/см³) («Диа-М», Россия). Для генерации ДК *in vitro* МПК культивировали в 48-луночной планшете в полной питательной среде (RPMI-1640, 10 % ЭТС, 10 mM Нерес, 2 mM L-глутамин («ICN Ph.», США) и пенициллина-стрептомицина-амфотерицина («ВІ», Израиль) в течение 6 суток (37⁰С, 5%CO₂) с заменой среды на 4-й день инкубации. Для индукции моноцитов в фенотип ДК применялись рекомбинантные цитокины ИЛ-4 (20 нг/мл) и ГМ-КСФ (100 нг/мл) («Milteniy Biotech», Германия), а также на 5-й день для завершения процесса созревания ДК вносили липополисахарид («Sigma», США). Графен добавляли в лунки на 4-е сутки инкубации в конечных концентрациях 5 и 25 мкг/мл (П-ОГм, рП-ОГ, П-ОГб, рП-ОГб). Для дальнейшего анализа клетки собирали при помощи реагента AccutaseTM («Capricorn Scientific», Германия). Окрашивание ДК на жизнеспособность проводили суправитальным красителем Zombie Aqua (ZA) («Biolegend», США). После процедур отмывок, клетки окрашивали антителами для определения процента ДК методом проточной цитометрии (CD14- Lin(CD3/CD19/CD56)-HLA-DR+) и зрелых ДК (CD83+). Окрашивание проводили антителами CD14-PerCP, Lin (CD3/CD19/CD56-AF 700), HLA-DR-AF 750 (все «R&D Systems», США), CD83-PE («eBioscience», США) по методике поверхностного окрашивания. Учитывая, что ОГ обладает собственной флуоресценцией [5], оценивали его поглощение клетками на проточном цитометре CytoFlexS (Beckman Coulter, США). Канал для детекции (лазеры 375 нм, 405 нм, 488 нм, 638 нм, фильтр 780±60 нм, для красителя PE-Cy7) был выбран в предварительных экспериментах по максимальной разнице медиан аутофлуоресценции моноцитов крови и флуоресценции наночастиц.

Статистическую обработку данных осуществляли в GraphPad Prism 8, с использованием two-way ANOVA для связанных выборок.

Результаты. При оценке общей жизнеспособности ДК было показано, что процент живых (ZA⁻) клеток в культурах колебался в пределах 93,63–95,94%. Достоверных различий между культурами выявлено не было.

При оценке влияния ОГ на экспрессию маркера терминальной дифференцировки CD83, было показано, что в культурах с низкой концентрацией частиц (5 мкг/мл) достоверных отличий по сравнению с контролем выявлено не было. Напротив, в культурах с наночастицами ОГ в концентрации 25 мкг/мл процент клеток, экспрессирующих поверхностный маркер CD83, был достоверно ниже, чем в контроле. Различий не было выявлено только в пробе с большими частицами ОГ, функционализированными линейным ПЭГ.

Для исследования поглощения ОГ клетками использовали среднюю интенсивность флуоресценции (в нашем случае – медиану флуоресценции) ДК по каналу для красителя PC-7 в пробах с наночастицами ОГ. Показатели медиан флуоресценции в пробах с 25 мкг/мл ОГ были достоверно выше медиан проб с 5 мкг/мл. Таким образом, увеличение концентрации наночастиц ОГ приводит к усилению поглощения частиц. Также рассчитывали индекс поглощения (ИП), отражающий среднюю интенсивность флуоресценции на одну клетку. Было показано, что в пробах с использованием П-ОГ в концентрации 5 мкг/мл ИП ниже, чем в пробах, которые инкубировались с частицами в концентрации 25 мкг/мл соответственно.

Однако достоверного влияния концентрации, размеров и типа пегилирования частиц ОГ на значения ИП не обнаружено.

Таким образом, наночастицы ОГ не оказывали влияния на жизнеспособность клеток и процентное содержание ДК в культуре. Наночастицы ОГ (25 мкг/мл) вызывали снижение уровня зрелых ДК в долговременной культуре, а также оказывали достоверный угнетающий эффект на экспрессию маркера CD83, за исключением П-ОГб. Кроме этого наночастицы ОГ в высокой концентрации (25 мкг/мл) активно поглощались ДК человека.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 19-15-00244

Список цитируемой литературы

1. Al Faruque M.A., Syduzzaman M., Sarkar J., Bilisik K., Naebe M. A Review on the Production Methods and Applications of Graphene-Based Materials // *Nanomaterials* (Basel). – 2021. – V. – 11(9). – 2414. doi:10.3390/nano11092414
2. Pescatori M., Bedognetti D., Venturelli E., Ménard-Moyon C., Bernardini C., Muresu E., Piana A., Maida G., Manetti R., Sgarrella F., Bianco A., Delogu L.G. Functionalized carbon nanotubes as immunomodulator systems // *Biomaterials*. – 2013. – V. 34. – P. 4395-4403.
3. Alcantar N.A., Aydil E.S., Israelachvili J.N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 2000. – V. 51(3). – P. 343-351.
4. Xu M., Zhu J, Wang F., Xiong Y., Wu Y., Wang Q., Weng J., Zhang Z., Chen W., Liu S. Improved in vitro and in vivo biocompatibility of graphene oxide through surface modification: poly (acrylic acid)-functionalization is superior to PEGylation // *ACS Nano*. – 2016. – V.10. – P. 3267-3281. doi: 10.1021/acsnano.6b00539.
5. Singh S.K., Singh M.K., Nayak M.K., Kumari S., Gra'cio J.J.A., Dash D. Characterization of Graphene Oxide by Flow cytometry and Assessment of Its Cellular Toxicity // *Carbon*. – 2011. – V. 49(2). – P. 684-692.

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

Быкова Я.Е.^{1,2}, Максимова Ю.Г.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: бактериальные биопленки, углеродные нанотрубки, метаболизм

Микроорганизмы в природе существуют в виде структурированных сообществ – биопленок, формирующихся на поверхности раздела фаз [1]. При сравнении планктонных и прикрепленных популяций выявлена одна из наиболее явных отличительных черт биопленок – наличие внеклеточного полимерного матрикса, в который заключены клетки [2]. В биопленке по-иному, в сравнении с планктонными культурами бактерий, происходят многочисленные физиологические процессы, в том числе продукция метаболитов и биологически активных веществ, поэтому актуально изучить воздействие углеродных нанотрубок на биопленки микроорганизмов.

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой протяжённые цилиндрические структуры диаметром от одного до нескольких десятков нанометров, длиной до нескольких сантиметров. Углеродные нанотрубки состоят из одной (однослойные) или нескольких (многослойные) свёрнутых в трубку графеновых плоскостей [3]. Целью настоящей работы явилось изучение влияния углеродных нанотрубок на метаболическую активность клеток бактериальных биопленок.

Объектами исследования являлись штаммы бактерий разных систематических групп: *Rhodococcus ruber* gt1, *R. erythropolis* 11-2, *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* ИЛ БИО, *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Alcaligenes faecalis* 2, *Pseudomonas fluorescens* C2, *Burkholderia dolosa* БОС, *Achromobacter pulmonis* ПНОС.

Углеродные нанотрубки серии «Таунит» (ООО «НаноТехЦентр», Россия), а именно «Таунит» олеофильные (внешний диаметр 20-50 нм, внутренний диаметр 10-20 нм, модифицированные остатками жирных кислот, до 15 масс. %), «Таунит» карбоксилированные (0,1-1,0 ммоль/г COOH-групп), Таунит-М (внешний диаметр 10-30 нм, внутренний диаметр 5-15 нм), «Таунит-М» гидрофильные («растворимые» в воде до 0,2%, в диметилацетамиде до 0,5%), одностенные УНТ (OCSiAl, Россия) «TUBALL» (внешний средний диаметр 1,6 нм) и неочищенные многостенные УНТ, синтезированные в Уральском научно-исследовательском институте композиционных материалов г. Пермь (83.0% C, 16.6% MgO, 0.3% Co, 0.1% Ni), добавляли в 0,9% раствор NaCl и среду LB до конечной концентрации 200 мг/л.

Влияние УНТ на дыхательную активность биопленок оценивали колориметрическим методом с использованием набора реактивов XTT Cell Proliferation Assay Kit («Roche», Germany). Бактериальную суспензию культивировали в полистерольном плоскодонном 96-луночном планшете на среде LB с добавлением УНТ в течение 7 суток.

Сформированные биопленки отмывали и вносили 0,9% раствор NaCl с добавлением реактива ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид). Измерения проводили на планшетном ридере Infinite M200 pro («Tecan», Швейцария) при ОП₄₈₀ через каждый час в течение 7 часов. Уровень влияния УНТ на метаболическую активность бактериальных клеток определяли, как отношение ОП_{экспер}/ОП_{контр} в конце инкубации. При значении, превышающем 1, делали вывод о повышении дыхательной активности, менее 1 – о снижении дыхательной активности.

Во второй серии опытов, выращенные на среде LB без добавок 7-ми суточные биопленки, отмывали, вносили 0,9% NaCl с УНТ и добавляли реактив ХТТ. Измерения проводили, как описано выше.

Метаболическую активность клеток биопленок оценивали после окраски реактивом PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. Биопленки выращивали в планшетах в течение 7-ми суток, отмывали фосфатным буфером, затем вносили 0,9% NaCl с УНТ, инкубировали в термостате. Через 1 час биопленки отмывали. В лунки вносили 0,9% NaCl и реактив PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. После 10 мин инкубации при температуре 37°C измеряли уровень флуоресценции при λ 560/590.

При оценке влияния УНТ на дыхательную активность биопленок методом окраски реактивом ХТТ было показано, что за исключением *P. fluorescens* C2, биопленки остальных изученных штаммов, сформированные в присутствии УНТ, содержали большее количество жизнеспособных клеток, чем контрольные.

Снижение дыхательной активности при воздействии УНТ на выращенные биопленки было отмечено у грамотрицательных бактерий, главным образом при воздействии гидрофильных УНТ. В других случаях дыхательная активность даже превышала контрольную (Таблица 1).

Таблица 1 – Влияние углеродных нанотрубок на дыхательную активность биопленок, соотношение ОП_{экспер.}/ОП_{контроль}

УНТ Штамм	Олео-фильные		Таунит-М		ОУНТ		Гидро-фильные		Карбоксили-рованные		нМУНТ	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
<i>R. erythropolis</i> ИЛ БИО	2.30	1.08	1.50	1.47	1.66	1.34	1.57	1.09	2.48	1.55	0.84	4.36
<i>R. erythropolis</i> 11-2	1.34	1.78	1.57	1.21	1.31	1.14	1.43	1.01	1.14	1.30	1.95	1.92
<i>Al. faecalis</i> 2	1.20	0.96	2.08	0.45	0.99	1.11	1.20	0.55	1.13	1.35	3.72	0.83
<i>Ps. fluorescens</i> C2	0.94	1.25	1.19	1.27	1.84	0.91	1.25	0.86	1.15	2.05	0.82	1.45
<i>A. pulmonis</i> ПНОС	1.29	1.49	1.24	0.58	1.21	0.91	0.87	0.62	1.12	1.20	1.65	1.26
<i>B. dolosa</i> БОС	1.42	1.84	1.04	1.04	1.31	2.13	0.97	3.13	1.03	2.15	0.45	0.80

Примечание: *a* – рост биопленки в присутствии УНТ, *b* – воздействие УНТ на выращенные биопленки; >1 – повышение дыхательной активности; <1 – снижение дыхательной активности; =1 – нет воздействия

Восстановление натриевой соли тетразолия (реактив ХТТ) во время активного метаболизма бактерий приводит к изменению окраски с желтой до оранжевой. ХТТ восстанавливается до растворимого соединения формазана во время аэробного метаболизма бактерий, при котором количество образующегося формазана пропорционально бактериальной биомассе. Увеличение количества живых клеток приводит к возрастанию количества дегидрогеназ в образце, и, следовательно, к более интенсивному восстановлению реактива ХТТ. Высокое значение поглощения раствора при длине волны 480 нм (более интенсивная оранжевая окраска) указывает на высокую метаболическую активность. Таким образом, более высокое значение поглощения раствора при реакции с выращенными в присутствии УНТ биопленками может свидетельствовать об увеличении количества жизнеспособных клеток в биопленках, тогда как возрастание этого показателя при воздействии УНТ на выращенные в полноценной питательной среде биопленки говорит о более интенсивном метаболизме в присутствии УНТ. Более интенсивный метаболизм может быть следствием воздействия УНТ на цитоплазматическую мембрану.

После окрашивания биопленок реактивом PrestoBlue™ Viability Reagent происходит восстановление резазурина до флуоресцирующего резорубина, окраска меняется с синей до розового. Из таблицы 2 видно, что явное снижение метаболической активности наблюдается при воздействии гидрофильных, карбоксилированных УНТ и Таунит-М.

Таблица 2 – Оценка метаболической активности клеток биопленок методом окраски реактивом PrestoBlue™ Viability Reagent, %

УНТ Штамм	Олео-фильные	Таунит-М	ОУНТ	Гидро-фильные	Карбокси-лированные	нМУНТ
<i>R. erythropolis</i> ИЛ БИО	84.4	30.3	109.1	29.0	58.2	90.7
<i>R. erythropolis</i> 11-2	77.2	8.9	91.0	25.8	60.1	36.5
<i>Al. faecalis</i> 2	123.5	90.8	113.9	61.1	72.5	75.2
<i>Ps. fluorescens</i> C2	127.7	15.7	98.4	19.9	19.7	12.2
<i>A. pulmonis</i> ПНОС	64.6	23.8	44.6	33.8	33.8	41.1
<i>B. dolosa</i> БОС	49.3	4.8	20.2	44.7	14.5	12.9

Примечание: 100% – метаболическая активность клеток без воздействия

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта № 20-44-596002

Список цитируемой литературы

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – “Город микробов?” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – т. 76, №2. – С. 149-163.
2. Flemming H.-C. Biofilms: An emergent form of bacterial life // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – V. 14. – P.563-575.
3. Lam, C.W. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks / C.W. Lam, J.T. James, R. McCluskey, S. Arepalli, R.L. Hunter // Crit Rev Toxicol. – 2006. – V. 36, N 3. – P. 189-217.

REAL-TIME МОНИТОРИНГ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ КАК СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ РАННЕГО ОТВЕТА НА СТРЕССЫ

Габова А.О.¹, Тюленев А.В.², Смирнова Г.В.², Октябрьский О.Н.²

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: real-time мониторинг, стрессы, *Escherichia coli*

Классическая оценка физиологических параметров растущих бактериальных культур, как правило, проводится с изъятием проб и последующим анализом с применением микробиологических и физико-химических методов. Отбор биоматериала и последующая подготовка для анализа сопряжена с различными воздействиями (изменением оксигенации, центрифугированием, сменой температурного режима и т.д.), которые являются стрессовыми для бактериальных клеток. В наибольшей степени затрагиваются параметры, связанные с дыхательной активностью и трансмембранными потоками ионов, которые отличаются быстрой реакцией на изменение условий окружающей среды. В результате, полученные значения соответствующих параметров могут значительно отличаться от наблюдаемых *in vivo*.

Один из вариантов решения этой проблемы – сочетание традиционных методов отбора проб с синхронной регистрацией важных физиологических параметров с применением электрохимических сенсоров, позволяющих производить измерение в режиме real-time времени непосредственно в растущей бактериальной культуре. Такой подход может быть полезным при изучении раннего ответа бактерий на такие стрессы как голодание, действие ксено- и антибиотиков, окислительный стресс, температурные и осмотические шифты. Такого рода стрессы являются неотъемлемой частью жизненного цикла бактерий в естественной среде обитания, а также могут возникать в биотехнологических процессах, связанных с культивированием микроорганизмов.

Материалы и методы. Для исследований использовали штамм *Escherichia coli* BW25113 (родительский штамм) из коллекции Keio. Бактерии культивировали на среде M9 с глюкозой в аэробных условиях. Все стрессовые воздействия проводили в середине экспоненциальной фазы роста.

В работе исследовался ответ аэробнорастущих бактерий на истощение глюкозы в качестве источника углерода, на голодание по аминокислотам (индуцировали блокадой синтеза изолейцина избытком 0,5 мг/мл валина) и на осмотический шифт (добавление в культуру 0,6 М хлорида натрия).

Real-time мониторинг и регистрацию физиологических параметров с применением электрохимических ион-селективных сенсоров проводили непосредственно в колбах (инвазивно). Все параметры непрерывно и синхронно обрабатывались в режиме реального времени с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего несколько блоков регистрации. Парциальное давление кислорода (dO_2) измеряли электродом Кларка InPro 6800 (Mettler Toledo) на модифицированном контроллере BioFlo 110 (NewBrunswickScientificCo., USA). Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли с помощью сульфид-специфичного ионоселективного халькогенидного электрода (pS^{2-}) XC-S²⁻-001 (Sensor Systems Company, РФ), изменение редокс-потенциала (Eh) регистрировали платиновым электродом ЭРП-105 («ИТ», РФ). Потенциометрические данные с этих электродов обрабатывались цифровыми рХ-метрами срХ-2 (ИБП, Пущино, РФ), работающими в синхронизированном режиме [1]. Параллельно, путем изъятия проб измеряли оптическую плотность культуры для расчета удельной скорости роста (μ) культуры.

Экспериментальная часть и обсуждение. При нормальном росте бактерий по мере накопления биомассы, несмотря на интенсивное перемешивание культуральной среды, дыхательная активность растущих клеток приводит к постепенному снижению парциального давления кислорода в среде (dO_2) до полного истощения. Учитывая это, все воздействия на культуру микроорганизмов осуществляли в диапазоне $dO_2 = 60\text{--}40\%$. В этих условиях бактерии росли с максимальной скоростью роста ($\mu = 0,75 \pm 0,03 \text{ час}^{-1}$), а продукция сульфида сохранялась на постоянном уровне. По мере истощения растворенного кислорода в среде Eh снижался в область отрицательных значений.

В условиях с дефицитом глюкозы, при истощении источника энергии, культура резко прекращала рост, с падением μ с максимального до нулевого значения. Одновременно с остановкой роста отмечалось резкое снижение дыхательной активности клеток, на что указывало увеличение растворенного кислорода в среде культивирования, а также резкие скачки потенциала как Eh электрода (в область отрицательных значений с амплитудой $37,9 \pm 0,3 \text{ мВ}$), так и сульфид-специфичного электрода (с амплитудой $27 \pm 1,7 \text{ мВ}$), что указывало на кратковременный выброс сульфида в среду культивирования.

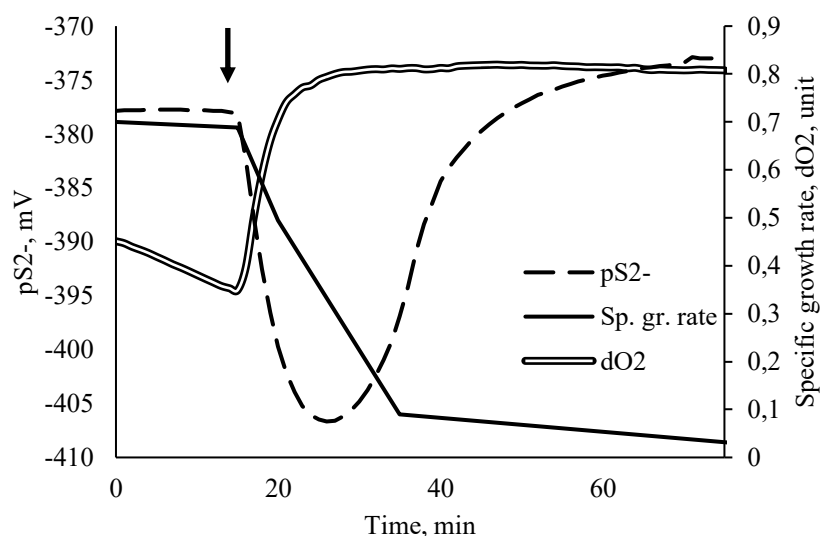


Рисунок 1 – Изменение pS^{2-} , удельной скорости роста и dO_2 при наступлении голодания по глюкозе (обозначено стрелкой)

Через 5 минут после индукции аминокислотного голодания наблюдалось падение скорости роста с $0,75 \pm 0,03 \text{ час}^{-1}$ до $0,17 \pm 0,02 \text{ час}^{-1}$, снижение потребления кислорода, с последующим медленным возобновлением дыхательной активности на новом уровне. Одновременно, в течение 12 мин регистрировалось обратимое падение потенциалов сульфидного и Eh электродов (на $17 \pm 1,5 \text{ мВ}$ и $30 \pm 2 \text{ мВ}$ соответственно), свидетельствующее об увеличении продукции эндогенного сульфида.

Осмотический шок вызывал ингибирование роста в течение 30-ти мин, сопровождавшееся двухфазным изменением дыхательной активности: в первой фазе наблюдалось резкое ингибирование дыхания, во второй – некоторое ускорение, с последующей стабилизацией на новом уровне.

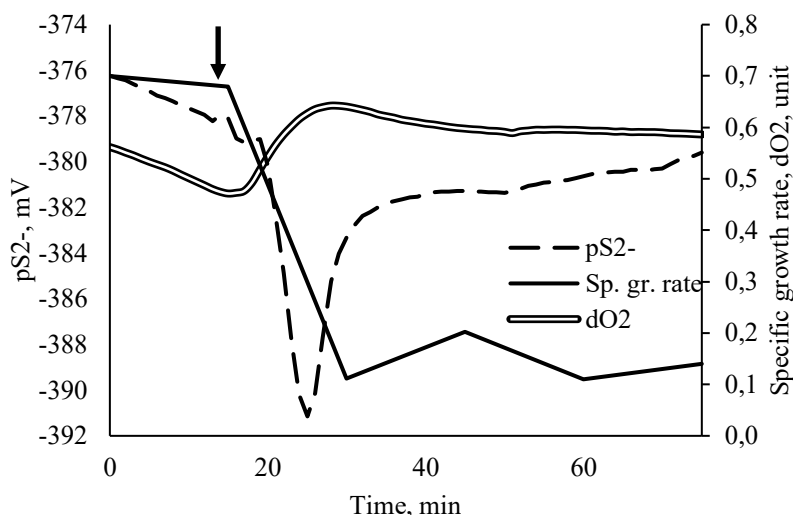


Рисунок 2 – Изменение pS^{2-} , удельной скорости роста и dO_2 при голодании по аминокислотам (время добавления валина обозначено стрелкой)

Как и при описанных выше стрессах, при осмотическом шифте остановка роста сопровождалась быстрым и обратимым скачком Eh в область отрицательных значений на $14,3 \pm 2,8 \text{ мВ}$, продолжающегося в течение 15 мин. Синхронно с изменениями Eh наблюдалось увеличение продукции эндогенного сульфида, о чем свидетельствовало изменение потенциала сенсора на $10,8 \pm 1,0 \text{ мВ}$. Следует отметить что, наблюдаемые при всех стрессах изменения потенциала Eh электрода коррелировали с изменениями концентрации экстраклеточного сульфида, регистрируемого pS^{2-} -электродом.

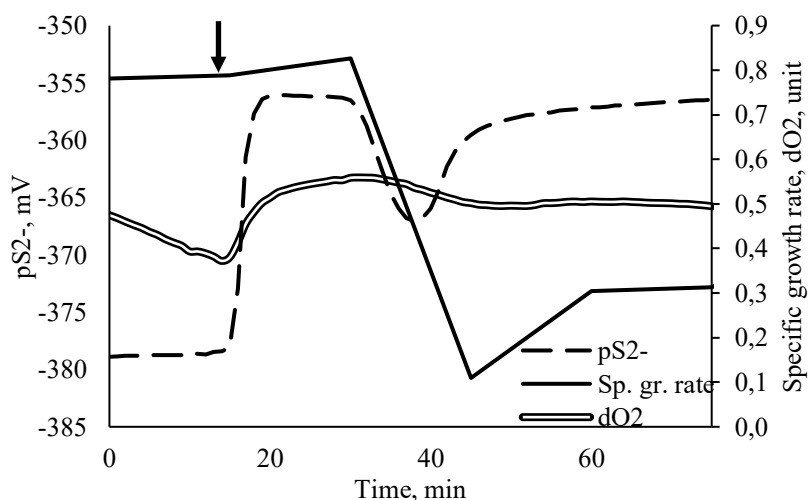


Рисунок 3 – Изменение pS^{2-} , удельной скорости роста и dO_2 при индукции осмотического шока (момент внесения NaCl обозначен стрелкой)

Применение комплексного подхода, включающего в себя мониторинг и регистрацию важных физиологических параметров в режиме real time в совокупности с классическими микробиологическими методами, позволили выявить тесную связь между такими параметрами как удельная скорость роста и дыхательная активность с одной стороны, и продукцией эндогенного сульфида, а также изменением редокс-потенциала культуры, с другой. Эти эффекты могут быть сопряжены с механизмом строгого ответа «stringent response» и поддержанием гомеостаза цистеина в резко меняющихся условиях окружающей среды [2].

Описанный в данной работе комплекс может применяться для экспресс-скрининга физиологического состояния бактериальной культуры в реальном времени без отбора проб с изъятием культуральной жидкости. Такая система может найти применение в биотехнологических процессах в системе экспресс регистрации и оповещения при возникновении нештатных или аварийных ситуаций, связанных с нарушением режимов культивирования микроорганизмов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 19-04-00888 и грантом Президента РФ для молодых ученых МК-420.2020.4.

Список цитируемой литературы

1. 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>.
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. DOI: 10.1007/s00726-019-02795-2

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOBACILLUS HELVETICUS* БИМ В-461 Г

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

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Ключевые слова: ферментативная активность, молочнокислые бактерии

Молочнокислые бактерии широко используются в пищевой промышленности для производства кисломолочных, квашеных продуктов, сыров, а также в фармацевтической – изготовление пробиотических препаратов. Особое внимание специалисты уделяют способности этих микроорганизмов продуцировать протеолитические и гликолитические ферменты. Основным субстратом для протеаз молочнокислых бактерий является белок молока казеин. Они способны расщеплять его при помощи ферментов до коротких пептидов и аминокислот, которые впоследствии используются для роста клеток микроорганизмов. С практической точки зрения протеазы играют существенную роль в пищевой промышленности, например, для созревания сыров [1].

При помощи гликолитических ферментов из углеводных субстратов клетки бактерий получают компоненты питания в виде низкомолекулярных соединений. Гидролазы широко используются в промышленности в составах моющих средств, при производстве текстиля, бумаги, а также продуктов питания [2]. Особое внимание в молочной промышленности получил фермент β-галактозидаза.

С его помощью получают безлактозное гидролизованное молоко, которое становится доступным для людей, страдающих непереносимостью лактозы. Фермент β -галактозидаза расщепляет лактозу до глюкозы и галактозы [3].

В связи с этим, целью нашей работы было изучение способности молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 Г синтезировать протеолитические и гликолитические (β -галактозидазу) ферменты.

Материалы и методы. В работе использовалась модифицированная капустная питательная среда (%): раствор кипяченой капусты – 20; пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 2,0; гидроортофосфат калия – 0,2; аммоний лимоннокислый – 0,2; лактоза – 2,0; натрий уксуснокислый – 0,5; магний сернокислый – 0,002; pH 6,8 – 7,0. Культивирование микроорганизмов осуществляли в течение 24 часов при температуре $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$, аэрация и перемешивание отсутствовали. Внеклеточные ферменты исследовали в надосадочной жидкости (внеклеточная фракция) при центрифугировании клеточной суспензии ($6\,000\text{ g} \times 25\text{ min} \times 4^\circ\text{C}$); внутриклеточную фракцию получали путем дезинтеграции биомассы при помощи ультразвука (частота излучения – 22 кГц, температура – $3 - 5^\circ\text{C}$, длительность – $5 - 6\text{ min}$); фракцию клеточной стенки получали при помощи обработки осадка в течение 4 ч 2М раствором NaCl.

Общий белок определяли по методу Bradford. Количественное определение активности протеиназы проводили методом Ансона в модификации И.С. Петровой и М.М. Винцюнайте [4]. Количественное определение активности β -галактозидазы определяли по методу Миллера [5]. Активность ферментов выражали в ед/мг белка. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. Исследование ферментативной активности показало, что штамм молочнокислых бактерий *L. helveticus* обладает протеолитической и гликолитической активностями. Исследовалась внеклеточная и клеточносвязанная (белки внутриклеточной фракции и фракции клеточных стенок) ферментативная активность.

При изучении протеолитической активности отмечены существенные отличия между количественными показателями внеклеточными и клеточносвязанными протеазами (рис. 1).

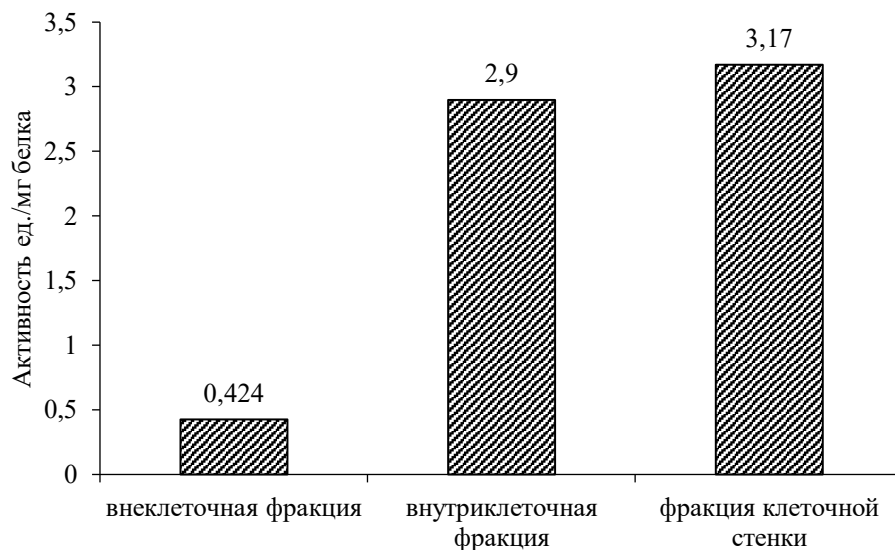


Рисунок 1 – Протеолитическая активность вне- и клеточносвязанных протеаз, продуцируемых бактериями *L. helveticus*

Минимальная протеолитическая активность наблюдалась при исследовании внеклеточной фракции – 0,424 усл.ед./мг белка, содержание общего белка в ней составляло 0,14 мг/мл. Во внутриклеточной фракции этот показатель был 2,9 усл.ед./мг белка, общее количество белка 1,3 мг/мл. Максимальный уровень протеолитической активности

наблюдался при изучении ферментов фракции клеточной стенки и составлял 3,17 усл.ед./мг белка, общее содержание белка в клеточной стенке – 2,2 мг/мл.

Количественные исследования β -галактозидазной активности клеточных фракций при том же содержании общего белка показали, что штамм молочнокислых бактерий продуцирует фермент с различной эффективностью. Так, слабой ферментативной активностью обладает внеклеточная фракция культуры (0,792 усл.ед./мг белка), средней – внутриклеточная фракция (60,54 усл.ед./мг белка). Самый высокий показатель активности фермента наблюдался при исследовании фракции клеточной стенки (370 усл. ед./мг белка) (рис. 2).

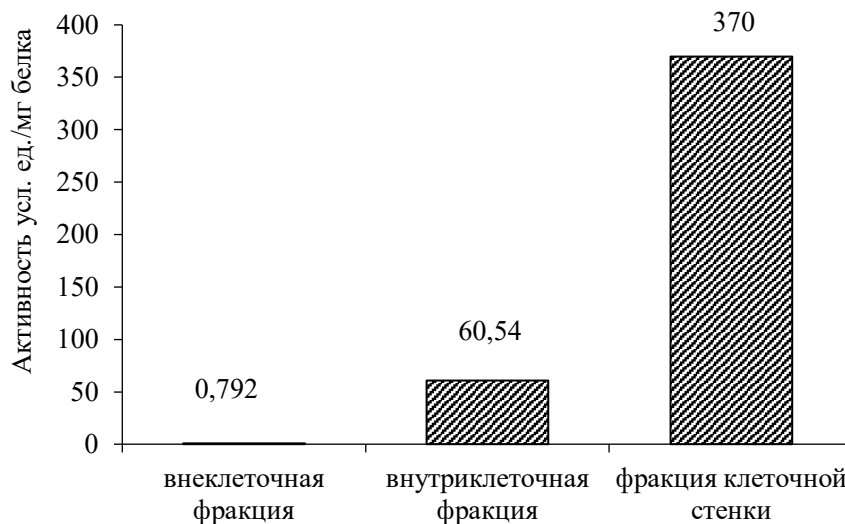


Рисунок 2 – β -галактозидазная активность вне- и клеточносвязанных ферментов, продуцируемых бактериями *L. helveticus*

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что изучаемые молочнокислые бактерии *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 Г практически не образуют внеклеточные протеазы и β -галактозидазу. Данные ферменты сосредоточены в двух структурах клетки: во внутриклеточной фракции и клеточной стенке, что соответствует имеющимся в литературе сведениям [6]. Максимальное количество исследуемых ферментов наблюдается в клеточной стенке бактерий.

Список цитируемой литературы

1. Китаевская, С. В. Изучение способности молочнокислых бактерий продуцировать липолитические ферменты / С. В. Китаевская // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 18. – С. 256-258.
2. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов Н.Н. Прикладная энзимология. – СПб: Университет ИТМО, 2019. – 160 с.
3. Карасева, А. В. Сравнение свойств промышленных β -галактозидаз для гидролиза лактозы в молочном сырье / А. В. Карасева, И. К. Куликова, Г. С. Анисимов, Г. В. Слюсарев // Вестник Северо-Кавказского федерального университета. – 2017. – Т. 60, № 3– С. 17-23.
4. Петрова, И.С. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробиологического происхождения / И.С. Петрова, М.М. Винцюнайте // Прикл. биохимия и микробиология. – 1980. – Т.2, вып. 2. – С. 322-327.
5. Miller, J. H. Experiments in molecular genetics / J. H. Miller. – N. Y. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. – 466 p.
6. Цихош, Г. Оценка ферментативной активности некоторых штаммов молочнокислых бактерий / Г. Цихош, Е. Рымашевски, М. Куявски // Известия вузов, пищевая технология. – 1992. – № 3-4. – С. 8-11.

ПОЛЕЗНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИЗ ТЕХНОГЕННО-МИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ (ХЕМОГЕННО-БИОГЕННЫЕ СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ)

Голдырев В.Н.

Естественнонаучный институт Пермского государственного национального
исследовательского университета, Пермь, Россия

Ключевые слова: техногенно-минеральные образования, техногенез, золото, хвостохранилища, горно-промышленные отходы.

В настоящее время человек является доминирующим по своей роли видом биосферы. Активная деятельность всех живых существ ведет к значительным планетарным переменам.

Как только человек стал сознательно, целенаправленно изготавливать орудия труда и пользоваться ими, он стал активно и по-своему преобразовывать окружающую среду. Человечество на основе разума, знаний и морально-этических норм регулирует новый геологический процесс – *техногенез*. Иными словами, человек выступает как геологическая сила [1-3]. Таким образом, техногенез – геологическая деятельность человечества, оснащенного техникой [2], целенаправленный процесс перестройки биосферы, земной коры, гидросферы и околоземного космоса в интересах человечества. Процессы, вызванные техногенезом, формируют различные техногенные объекты или *техногенно-минеральные образования* (ТМО).

В России быстрыми темпами идёт наращивание объёмов техногенного материала, который называют отходами производства и потребления, негативно воздействующих на окружающую среду и здоровье населения. Обращение с отходами – один из важнейших аспектов национальной безопасности и в то же время острейшая экологическая проблема.

Ситуация особой сложности складывается с накоплением и утилизацией горнопромышленных отходов (ГПО). Из накопленных в России более 100 млрд т твердых отходов 70% приходится именно на ГПО (из доклада Президента В.В. Путина). Отечественные горные предприятия ежегодно складировуют около 5 млрд т вскрышных пород и около 700 млн т направляют в отвалы обогатительных фабрик. А утилизируется только 30-35% ГПО.

Стоит заметить, что ГПО высокоопасные вещества, хвосты обогащения относятся к второму и выше классу токсичности. Однако, объёмы полезных компонентов в ГПО сопоставимы с запасами крупных месторождений: по данным Госкомстата РФ в отходах цветной металлургии содержится, тыс. т: меди – 7800, свинца – 980, цинка – 9000, олова – 540, никеля – 2480, вольфрама – 130, молибдена – 115 и др. Общее количество железа в отходах черной металлургии достигает 170 млн т [4, 5]. В техногенных золотосодержащих объектах находится 5022 т золота (что соответствует примерно 57% массы его добытого в стране).

ТМО представляют собой потенциальные комплексные *техногенные месторождения* со значительными запасами цветных, редких, благородных металлов и неметаллических полезных ископаемых. Коренные изменения в технологиях извлечения могут сделать экономически выгодной вторичную переработку ТМО.

В настоящее время в России осуществляется переход к наилучшим доступным технологиям (НДТ), который официально стартовал в 2014 году с принятием Федерального закона, по которому предприятия должны внедрять экономически рентабельные технологии, минимизирующие образование отходов и выбросов.

В числе справочников, аккумулирующих данные о НДТ, касающихся отраслей переработки минерального сырья, такие, как «Добыча драгоценных металлов», «Добыча и обогащение руд цветных металлов» и др. Однако они не содержат сведений по технологиям переработки отходов соответствующих производств.

Специальный справочник «Утилизация и обезвреживание отходов» также не касается минеральных отходов рассматриваемых отраслей. Таким образом, переработка отходов и доизвлечение ценных компонентов «выпало» несправедливо из внимания природоохранных проблем, но остается, тем не менее, одной из главных задач отрасли.

Безусловно, одним из основных направлений утилизации отходов горнодобывающей промышленности являются получение металлов и других ценных компонентов из техногенного сырья, а также производство строительных материалов или прямое использование отходов в стройиндустрии без дополнительной переработки.

На сегодняшний день по причине противоречий в нормативно-правовых документах, регулирующих классификацию и использование ТМО, их уровень освоения крайне низок. ООО «Ресурсы Малого Хингана» получают оловянный концентрат из лежалых хвостов ГОКа «Хинганолово» с применением гравитационной центробежной концентрации. АО «Закаменск» ведет освоение техногенного Барун-Нарынского месторождения вольфрама в Республике Бурятия. Предприятие «Специальные материалы» (Сибирская генерирующая компания), расположенное на территории Беловской ГРЭС, занимается переработкой золошлаковых отходов и выпускает уникальный продукт – алюмосиликатные микросферы, востребованные в самых разных отраслях промышленности. Магнитогорский металлургический комбинат разработал и внедрил технологию переработки шлама с получением железного концентрата, основанную на методе винтовой сепарации.

При подходах к использованию ТМО крайне важно понимать, что полезные компоненты, содержащиеся, например, в хвостах обогащения, не распределяются равномерно по всему объему хвостохранилища, а образуют довольно четкие и пространственные зоны повышенных концентраций. Металлоносные участки имеют сложное внутреннее строение и представлены системой разобщенных пластообразных, линзообразных, изометричных и неправильной формы тел с повышенным содержанием различных полезных металлов. Расположение зон повышенных концентраций определяется как техногенными (технология обогащения, используемые реагенты, периоды отработки месторождения, положение пульповода), так и природными (гипергенными) процессами. Созданные ТМО «приспосабливаются» к новым условиям геологической среды, вследствие чего происходит преобразование (разрушение) неустойчивых минералов с образованием новых пород и минералов [3, 6].

Динамику и кинематику процессов разрушения определяют различные факторы: 1) *механическое разрушение* – инсоляция, колебания температур (сезонное и суточное), теплоемкость и теплопроводность пород, замерзание вод в трещинах; 2) *физико-химическое разрушение* – окисление, растворение, гидратация, гидролиз; 3) *биохимическое разрушение* – действие микроорганизмов, бактерий, водорослей, грибов, которые выступают в роли катализаторов или ингибиторов.

Высвободившись из первичной рудной матрицы, полезные компоненты (Au другие металлы) интенсивно перераспределяются водами отвалов, мигрируя из одних горизонтов и накапливаясь в других. Причем, металлы могут находиться как в растворенном состоянии, так и в твердом виде (взвесь). Важное значение для осаждения металлов из вод имеет совокупность геохимических условий (пород, минералов, физико-химических показателей среды), создающих геохимические барьеры. Так, хвосты обогащения Карамкенской ЗИФ (Магаданская область) с содержанием Au 0,1-0,2 г/т, формируют горизонты вторичного обогащения: на контакте с мерзлотным слоем отвала (~0,5 г/т), корка кристаллогидратов сульфатов железа в приповерхностной части отвала (~20 г/т) [7].

Исходя из всего вышеизложенного, можно сделать вывод, что для извлечения полезных компонентов из ТМО человеку необходимо создать определенные условия среды, при которых природа самостоятельно произведет разрушение, перенос, дезинтеграцию и аккумуляцию рудного материала.

Нами выделены следующие направления по управлению формированием концентраций золота в ТМО [8]: 1) механическая дифференциация, создание механических барьеров –

концентрация металла в локальной зоне отвалов путем формирования механических барьеров-ловушек; 2) биохимическая дифференциация, образование пленок на поверхности золота и других металлов; 3) физико-химическая дифференциация, создание геохимических барьеров в зонах разгрузки золотосодержащих техногенных вод (гидроминеральное сырье).

На данный момент времени авторами изучается прикладной аспект физико-химической дифференциации золота. Проведены эксперименты [8] по аккумуляции золота на геохимических барьерах: 1) щелочной (карбонатный) – для кислых вод. Зафиксировано восстановление растворенного золота до самородного на карбонатном барьере в бетонном отстойнике; 2) электрохимический на металлической сетке – осаждение золота из техногенных вод на медной проволоке за счет природного электролиза; 3) сорбционный (углистый) – сорбция нанозолота на угольной поверхности. Расчет показал, что с одного сорбционного модуля при содержании $0,034 \text{ г/м}^3$ в исходных техногенных водах за год извлекается не менее 15 грамм золота [9].

Таким образом, ТМО должны рассматриваться не как «отходы производства», а как неоцененный минеральный ресурс. Комплексный подход к изучению и использованию, оценка минеральных ресурсов ТМО принесут существенный экономический, экологический, научный эффект.

Список цитируемой литературы

1. Ферсман А.Е. Геохимия. Т. III. Л.: ОНТИ–ХИМТЕОРЕТ. 1937. 503 с.
2. Емлин Э.Ф. Техногенез – новейший этап геологической истории рудных месторождений Урала // Известия вузов. Горный журнал 1993. №5. С. 23-146 с.
3. Наумов В.А. Минерагения, техногенез и перспективы комплексного освоения золотоносного аллювия. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора геолого-минералогических наук / Пермский государственный университет. Пермь, 2010. 42 с.
4. Киперман Ю.А., Комаров М.А. Горно-промышленные отходы в формировании ресурсосберегающей природоохранной политики // Минеральные ресурсы России. Экономика и управление. – 2016. – № 1-2. -С. 68-73.
5. Нетрадиционные источники получения титана и редких металлов / Л.З. Быховский, В.С. Кудрин, Л.П. Тигунов [и др.]/Геология, методы поисков, разведки и оценки месторождений твердых полезных ископаемых. Обзорная информация. Вып. 4-5. – М.: ЗАО "Геоинформцентр", 2003.
6. Наумов В.А., Наумова О.Б., Голдырев В.Н. Алгоритм прогнозной оценки перспектив использования и управления составом техногенно-минеральных образований месторождений золота. В сборнике: Россыпи и месторождения кор выветривания XXI века: задачи, проблемы, решения. Материалы XVI Международного совещания по геологии россыпей и месторождений кор выветривания. Воронеж, 2021. С. 235-236.
7. Глотов В.Е., Савва Н.Е., Смирнова О.К., Филенко Р.А., Юргенсон Г.А. Особенности геохимии Карамкенского хвостохранилища // В сборнике: Минералогия и геохимия ландшафта горнорудных территорий. Современное минералообразование. Материалы IV Всероссийского симпозиума с международным участием и X Всероссийских чтений памяти академика А.Е. Ферсмана. 2012. С. 27-30.
8. Наумов В.А., Фиоруччи А., Голдырев В.В., Брюхов В.Н., Фетисов В.В. Научные основы управления геологическими процессами в техногенно-минеральных образованиях // Международный научно-исследовательский журнал. 2018. № 9-1 (75). С. 89-92.
9. Брюхов В.Н., Голдырев В.В., Наумов В.А., Мовзитова К.И. Сорбционный модуль для извлечения золота // Патент на полезную модель 197815 u1, 29. 05. 2020. Заявка № 2020106373 от 10. 02. 2020.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ КРОВИ НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПОД ДЕЙСТВИЕМ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ С ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Горобец М.Г., Абдуллина М.И., Бычкова А.В.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
Москва, Россия

Ключевые слова: активные формы кислорода, наночастицы, белки.

Наночастицы оксидов железа в течение последних десятилетий активно используются при создании материалов биомедицинского назначения: материалов для адресной доставки лекарственных веществ, магнитной гипертермии, магнитной сепарации, магнитно-резонансной томографии и др. [1]. Известно, что наночастицы оксидов железа в физиологических условиях обладают активностью ферментов пероксидазы и каталазы, такие частицы получили название IONzymes [2]. IONzymes вызывают генерацию активных форм кислорода (АФК) в присутствии пероксида водорода и могут подавлять рост опухоли, способствуя ферроптозу ее клеток [3]. Несмотря на широкое применение, которое находят магнитные наночастицы (МНЧ) в современной медицине, многие их особенности, связанные с физико-химическими свойствами наночастиц, изучены не в полной мере, одним из таких аспектов является генерация АФК поверхностью МНЧ в присутствии белков крови. Этот вопрос актуален в связи с тем, что при введении в организм через кровь МНЧ взаимодействуют со многими белками, образующими на их поверхности «белковую корону» [4]. Известно, что белки «белковой короны» влияют на распределение частиц и их функционирование в организме, но остается слабо исследованным вопрос, сохраняют ли поверхность МНЧ способность к генерации АФК после связывания с ней белков.

Целью данной работы является оценка генерации АФК поверхностью МНЧ под действием пероксида водорода в присутствии и в отсутствии белков, оцениваемая с помощью субстрата – о-фенилендиамина (о-ФДА), взаимодействующего с АФК с образованием продуктов окисления с максимумом поглощения при 415-455 нм (окФДА). В качестве дополнительного источника генерации АФК действием пероксида водорода использовалась пероксидаза хрена (HRP). Модельными белками были выбраны человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), гемоглобин (Hb), имеющие близкие молекулярные массы и способные вовлекаться в окислительные процессы под действием АФК.

Показана генерация АФК под действием МНЧ и HRP в присутствии пероксида водорода, под действием МНЧ в диапазоне концентраций от 0,004 до 0,159 мМ количество продукта пропорционально концентрации МНЧ (рис. 1а).

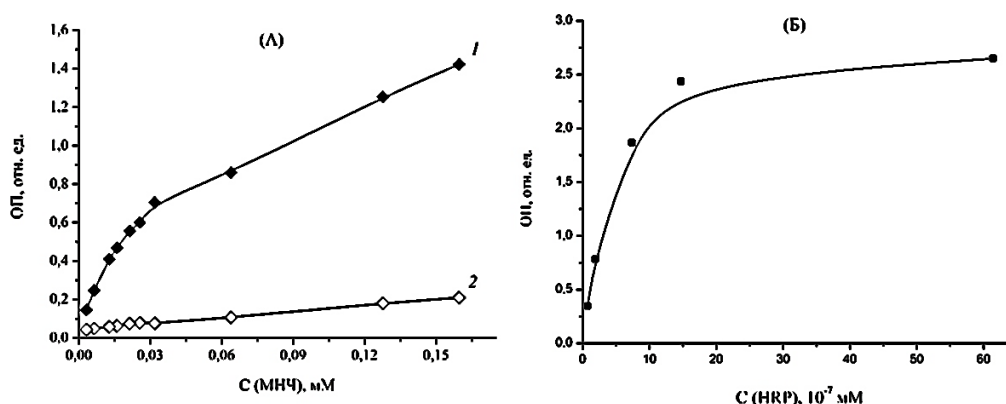


Рисунок 1 – Зависимость ОП ($\lambda_{\text{max}} = 418$ нм) продукта окисления о-ФДА от времени при варьированной концентрации различных источников генерации АФК: А – МНЧ: 1 – МНЧ + о-ФДА (0,075 мМ) + H_2O_2 (9,8 мМ); Б – HRP: HRP + о-ФДА (3,1 мМ) + H_2O_2 (0,35 мМ)

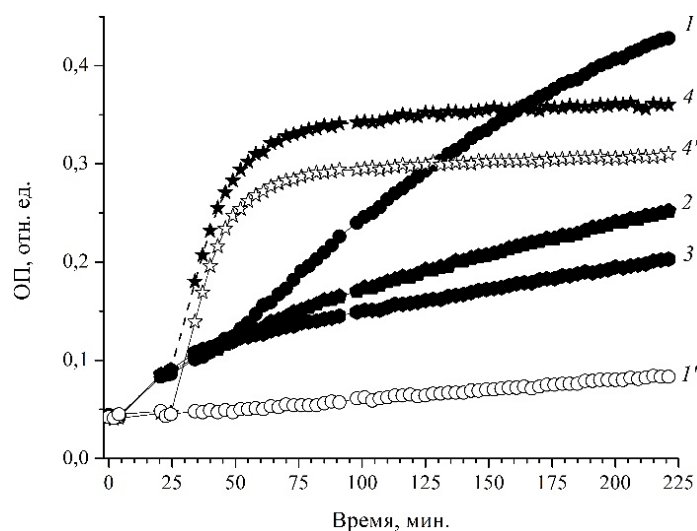


Рисунок 2 – Зависимость ОП ($\lambda_{\text{max}} = 418$ нм) продукта окисления о-ФДА (окФДА) от времени в растворах, содержащих МНЧ (1-4) и не содержащих МНЧ (1', 4'), отличающихся присутствием белка: 1, 1' – без белка, 2 – с ЧСА ($7,5 \cdot 10^{-5}$ мМ), 3 – с ЧСА (0,02 мМ), 4, 4' – с Нб ($7,5 \cdot 10^{-5}$ мМ). С (H_2O_2) = 9,8 мМ, С (о-ФДА) = 0,075 мМ, С (Fe_3O_4) = 0,020 мМ

Эффект снижения генерации продукта окисления о-ФДА может быть связан с перехватом белками АФК, генерируемых поверхностью МНЧ в присутствии пероксида водорода или стерическим экранированием поверхности МНЧ белками при адсорбции, снижающем доступ о-ФДА к поверхности МНЧ, а соответственно и возможность генерации продукта окисления под действием поверхности частиц. Гипотеза по перехвату АФК белками была оценена с использованием HRP в качестве источника генерации радикалов. Было показано, генерация продукта окисления о-ФДА под действием HRP не снижается в присутствии ЧСА и Нб. Вследствие этого явления наиболее вероятной причиной снижения генерации продукта представляется взаимодействие белков с поверхностью МНЧ, приводящее к блокированию данной поверхности и невозможности детекции АФК с помощью о-ФДА.

Вероятно, продемонстрированный нами эффект экранирования белками поверхности МНЧ может иметь место вследствие взаимодействия МНЧ с белками *in vivo*, а также при создании гибридных содержащих белок покрытий на поверхности МНЧ для терапии и диагностики опухолей.

Список цитируемой литературы

1. Savliwala S., Chiu-Lam A., Unni M., et al. Magnetic nanoparticles. In: Chung E.J., Leon L., Rinaldi C., editors. Nanoparticles for Biomedical Applications. Amsterdam: Elsevier. – 2020. – P. 195–221.
2. Gao L., Fan K., Yan X. Iron oxide nanozyme: A multifunctional enzyme mimetic for biomedical applications // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7. – №13. – P. 3207–3227. doi:10.7150/thno.19738
3. Kim S.E., Zhang L., Ma K., et al. Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth // *Nat Nanotechnol.* – 2016. – V. 11. – P. 977–985. doi: 10.1038/nnano.2016.164
4. Gunawan C., Lim M., Marquis C.P. Nanoparticle–protein corona complexes govern the biological fates and functions of nanoparticles // *Journal of Materials chemistry. B.* – 2014. – V. 2. – №15. – P. 2060–2083. doi: 10.1039/c3tb21526a.
5. Прусаков В.Е., Максимов Ю.В., Нищев К.Н., и др. Гибридные, биodeградируемые нанокомпозиты на основе биополиэфирной матрицы и магнитных наночастиц оксида железа: структурные, магнитные и электронные характеристики // *Химическая физика*. 2018. – Т.37. – №1. – С.83–90.

6. Bovaird J.H., Ngo T.T., Lenhoff H.M. Optimizing the O-Phenylenediamine Assay for Horseradish Peroxidase: Effects of Phosphate and PH, Substrate and Enzyme Concentrations, and Stopping Reagents. Clin. Chem. – 1982. – V. 28 (12). P. 2423–2426.

ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АКРИЛОВОГО ГИДРОГЕЛЯ ДЛЯ ВЛАГОУДЕРЖАНИЯ, СТИМУЛИРОВАНИЯ РОСТА РАСТЕНИЙ И НОРМАЛИЗАЦИИ ПОЧВЕННОЙ СРЕДЫ

Елисеева А.Д.^{1,2}, Яхина А.И.¹, Литасова А.С.^{1,2}, Емельянова Н.С.¹, Максимов А.Ю.^{1,2,3}

¹ Лаборатория агробиофотоники ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия

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

Ключевые слова: акриловые полимеры, гидрогели, защита растений, фитопротекторы

Акриловые полимеры являются распространенной группой материалов, имеющих широкий спектр промышленного применения: это конструкционные и строительные материалы, лаки, краски, клеи, сорбенты, флокулянты, суперабсорбирующие вещества для медицины и сельского хозяйства (влагоудерживающие препараты). Объем их производства и ассортимент растут экспоненциально в течение последних 20-ти лет. [1-4]

С помощью методов полимеризации раствора или обратной суспензии из акриловой кислоты, ее солей и акриламида часто получают большинство современных анионных гидрогелей, абсорбентов и флокулянтов. Суперабсорбенты успешно применяются в качестве почвенных препаратов в садоводческой отрасли для улучшения физических свойств почвы, с целью повышения их водоудерживающей способности и/или удержания питательных веществ в песчаных почвах. С учетом водопоглощающих характеристик данных материалов все шире исследуются возможности их применения для решения некоторых сельскохозяйственных проблем. В частности, применение гидрогелей позволяет снизить частоту полива и уплотнение почвы, остановить эрозию и сток воды, повысить аэрацию почвы и микробиологическую активность. Суперабсорбенты (гидрогели) позволяют аккумулировать, удерживать влагу в течение длительного промежутка времени и постепенно отдавать ее растениям [2,3,5].

Внесенные в почву полимеры абсорбируют и сохраняют значительное количество воды и питательных веществ, высвобождая их постепенно, в соответствии с потребностями растения. Таким образом, рост растений улучшается за счет равномерного и систематического снабжения, которое сохраняется в течение всего периода вегетации [6-10]. Также показано положительное влияние гидрогелей на формирование и сохранение средообразующей микрофлоры почвы [11].

Целью настоящего исследования является разработка состава и способов получения комплексных препаратов для растениеводства с функциями стимуляции роста растений, влагоудержания, устойчивости к вымыванию из почвы, с фитопротективным действием.

Разрабатываемая технология предназначена для использования в растениеводстве, включая овощеводство, производство зернобобовых культур, выращивание рассады плодовых культур, декоративное растениеводство, городское озеленение. Получаемые комплексные препараты предназначены для улучшения всхожести семян, роста культурных растений и повышения их урожайности.

Разрабатываемые препараты обладают способностью к влагоудержанию, нормализации водного режима почв и корневой системы растений, питания и стимуляции роста растений, защиты растений от потенциальных патогенов, корневой гнили, высыхания.

Синтез полимерной основы гидрогелей – осуществляли классическим методом. Полиакриламид линейный и поперечносшитый, 15%, готовили в лаборатории методом свободнорадикальной сополимеризации 14% акриламида (или смеси акриамида и акрилата) 1% метиленбисакриламида с использованием в качестве пары окислитель/восстановитель 0,01% персульфата аммония и 0,02% тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД). Синтезированы следующие варианты гидрогеля (Таблица 1):

Агрегатное состояние и влагопоглощение 15%-процентных полимеров

Полимер	Агрегатное состояние	Влагопоглощение
15% полиакриламид (ПАА) поперечно-сшитый	Упругий гель	145 мл/г
15% полиакрилат натрия (ПАК-Na) поперечно-сшитый	Упругий гель	475 мл/г
15% полиакрилат аммония (ПАК-NH ₄) поперечно-сшитый	Упругий гель	415 мл/г
сополимер 7,5% ПАА – 7,5 ПАК-Na поперечно-сшитый	Упругий гель	320 мл/г
сополимер 7,5% ПАА – 7,5 ПАК-NH ₄ поперечно-сшитый	Упругий гель	315 мл/г
15% полиакриламид (ПАА) линейный	Вязкий раствор	Не ограничено
15% полиакрилат натрия (ПАК-Na) линейный	Вязкий раствор	Не ограничено
15% полиакрилат аммония (ПАК-NH ₄) линейный	Вязкий раствор	Не ограничено
сополимер 7,5% ПАА – 7,5 ПАК-Na линейный	Вязкий раствор	Не ограничено
сополимер 7,5% ПАА – 7,5 ПАК-NH ₄ линейный	Вязкий раствор	Не ограничено

Наиболее высокой влагоудерживающей способностью среди полученных 15-процентных синтетических полимеров обладал поперечно-сшитый полиакрилат натрия (ПАК-Na). Исследована биodeградация полученных полимеров бактериями почвенной вытяжки в среде, близкой по составу почвенному раствору. Показано, что наиболее эффективно биodeградации подвергался линейный полиакриламид, характеризующийся наибольшей доступностью для ферментов микроорганизмов. В случае биodeградации поперечно-сшитого полиакриламида, ее скорость была 1,5-2,2 раза ниже, чем для всех исследованных штаммов, что объясняется наличием объемной структуры, внутренняя часть которой недоступна для ферментов. В ходе исследования было показано, что убыль массы полимера в течение длительного периода биodeградации (180 сут) составила 22%.

Было установлено, что полимерная основа получаемых композиционных материалов является биоразлагаемой. Расчётный период работы препарата в почве составляет 3 года (с постепенным снижением водосорбционных свойств). Разработан процесс получения гидрогелей, содержащих органические стимуляторы роста растений – фитогормоны. В модельном эксперименте определено влияние гидрогеля и комплексного препарата, содержащего фитогормоны, на рост модельных растений томатов сорта "Серебристая ель" установлено, что при внесении чистого гидрогеля прирост длины стебля/длины корня/массы по сравнению с контролем составлял 33,6/23,4/37,5%. В варианте с внесением препарата со стимуляторами роста прирост тех же показателей составил 60,3/ 80,2/86,3% соответственно.

Получение комплексных препаратов с живыми культурами бактерий дает следующие преимущества: клетки родококков и псевдомонад – продуцентов амидтрансформирующих ферментов, модифицируют амидные группы полимера, постепенно повышая его

влагоудерживающую способность в почве и улучшая азотное питание. Кроме того, метаболиты бактерий стимулируют рост растений и улучшают состояние почвенной среды.

Установлено, что при внесении чистого гидрогеля прирост длины стебля/длины корня/массы по сравнению с контролем составлял 33,6/23,4/37,5%. При внесении комплексных препаратов прирост длины стебля / длины корня / массы по сравнению с контролем составлял 58,4/56,7/52,4% для КПР, 62,4/83,3/69,44% для КПП. Таким образом, при внесении комплексных препаратов с бактериями происходит увеличение скорости роста и накопления биомассы рассады. В качестве препаратов близких по сфере применения являются влагоудерживающие гидрогели китайского, немецкого, индийского, американского производства, не обладающие иными полезными качествами, кроме влагоудержания, такие как гидрогель Эвабеона (Китай), «STOCKOSORB» (Германия), «SIGMA» (Китай), «AquaReserve» (Индия).

Показано, что гидрогели, полученные в настоящем исследовании, превосходят популярные аналоги по уровню влагоудержания в почвенной среде, под механическим давлением слоя почвы толщиной около 10 см. Полные аналоги разрабатываемых комплексных препаратов на Российском и мировом рынке отсутствуют. Разработана технологическая схема получения композиционных материалов на основе азотсодержащих полимерных соединений.

Работа поддержана в рамках государственного задания АААА-А19-119051390040-5, в части разработки технологии синтеза полимерных гидрогелей, а также проекта международных исследовательских групп (соглашение № С-26/507 от 09.03.2021), финансируемого Минобрнауки Пермского края, в части исследования комплексных препаратов.

Список цитируемой литературы

1. Jiang Z., Cao X. Synthesis and swelling behavior of poly (acrylic acid-acryl amide-2-acrylamido-2-methyl-propansulfonic acid) superabsorbent copolymer // J. Petrol. Explor. Prod. Technol. – 2017. – V.7. – P. 69-75
2. Будников В. И., Смагин А. В. Композиционный влагоудерживающий материал и способ его получения // патент №217. 015.F858. – 2017
3. Mohammad J. Kabiri K. Superabsorbent Polymer Materials: A Review // Iranian Polymer J. – 2008. – V.17 (6). – P.451-477
4. Chalker-Scott L. Super-absorbent water crystals// Mastergardener.- 2007 P.35-38
5. Кильмухаметов М.Д. Обзор современных технологий получения суперабсорбирующих полимеров для комплекса акриловой кислоты // Башкирский химич. жур. – 2014. – Т.21 (2). – С. 5-12.
6. Barihi R. Panahpour E., Mirzae Beni M.H. Super Absorbent Polymer and its Application in Agriculture // World of Sciences Journal. – 2013. – V.01 (15). – P.223-228.
7. Туз М.С., Гамаюнова В.В. Влияние суперабсорбентов, предпосевной обработки семян и внекорневых подкормок на полевую схожесть и выживаемость растений гороха в условиях южной степи Украины // Науч. жур. Росс. НИИ проблем мелиорации. – 2015. – 20(4). – 135–146.
8. Ekebafe L.O., Ogbeifun D.E., Okieimen F.E. Polymer Applications in Agriculture // Biochemistry. – 2011. – Vol. 23 (2). – P. 81-89
9. Воскобойникова Т.Г., Околелова А.А. Повышение плодородия почв в сухостепной зоне с помощью гидрогелей. – Изд-во Томского политехнического университета, 2014. – С. 19-20.
10. Наумов П.В., Щербакова Л.Ф. Оптимизация влагообеспеченности почв с помощью полимерных гидрогелей // Изв. нижеволжского агроуниверситетского комплекса. – 2011. – 24(4). – С. 77-81.

11. Максимова Ю.Г., Максимов, А. Ю., Демаков В.А., Будников В.И. Влияние гидрогелей полиакриламида на микрофлору почвы // Вестник пермского университета, Серия: Биология. – 2010. – V.1(1). – Р. 45-49.

НОВЫЙ ВИД СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *DESULFOSPOROSINUS*, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ, СПОСОБНЫЙ К ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ.

Еськова А.И.¹, Пономарева А.Л.¹, Рыжманова Я.В.², Щербакова В.А.²

¹ Тихоокеанский океанологический институт имени В.И. Ильичева, ДВО РАН,
Владивосток, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук (ИБФМ РАН), Пущино, Россия

Ключевые слова: Японское море, донные отложения, сульфатредуктор, окисление углеводородов, *Desulfosporosinus*

Введение. Северная часть Японского моря представляет особый интерес из-за своего геологического строения, и как район, где были обнаружены газогидратные скопления [1]. Как известно, существует закономерная связь между нефтяными и газовыми проявлениями, и эта связь подтверждена многолетней практикой разработки известных морских месторождений [2]. Чаще всего в литературе встречаются данные о нахождении сульфатредуцирующих бактерий из мест нефтепроявлений, но информации о нахождении сульфатредукторов из мест газогидратных скоплений северной части Японского моря нет; в связи с чем, цель нашей работы: выделить культивируемый штамм сульфатредуцирующей бактерии, и оценить его способность к окислению углеводородов нефти.

Материалы и методы. В работе использовали верхнюю часть восстановленного слоя донных отложений северной части Японского моря, отобранную в ходе рейса ОР-54 НИС «Академик А.И. Опарин» (2017) ТОИ ДВО РАН. Для выделения и идентификации сульфатредуцирующих микроорганизмов были созданы накопительные культуры на анаэробно приготовленной среде 195 (*Desulfobacter medium*), DSMZ. В накопительных культурах фиксировали образование сероводорода, в качестве индикатора процесса сульфатредукции. Пробы, в которых был зафиксирован сероводород пересевали на агаризованные среды того же состава для получения чистых культур. Для выделения ДНК использовали метод, предложенный Мармуром в модификации [3]. Секвенирование участка гена 16S рРНК сульфатредуцирующей бактерии проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования "Геном" ИМБ РАН с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems. Визуализацию морфологии чистых культур проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа Evo 40 (Carl Zeiss AG, Германия), на базе отделения электронной микроскопии "Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского" ДВО РАН. Углеводородокисляющую активность определяли на хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS 2010 Ultra (ТОИ ДВО РАН).

Результаты. Из донных отложений станции ОР54-20а (станция расположена в районе скопления газогидратов), с глубины 592 метра от поверхности моря был выделен штамм, принадлежащий к роду сульфатредуцирующих бактерий *Desulfosporosinus*. На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК ближайшим соседом с 98.5% сходства является *D. lacus STP 12^T* (AJ582757) – бактерия, выделенная из донных отложений озера Штехлин, Германия [4].

Полученная нуклеотидная последовательность гена *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8 была депонирована в GenBank под номером MT740695.2, а также во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКР) ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН под номером В-3540. При оценке способности к деградации углеводородов *Desulfosporosinus* sp.nov. SRJS8 и референс-штамма *Desulfosporosinus lacus* было выявлено, что оба штамма способны к окислению углеводородов нефти. При этом отмечено, что SRJS8 обладал большей способностью к биodeградации нефти, чем *D. lacus*. В большей степени *Desulfosporosinus* sp. nov. SRJS8 окислял нондекан (100%), в меньшей- пентакозан (3%).

Работа выполнена в рамках темы Госзадания: 2019-2023, 0211-2021-0012 «Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, геохимических, геологических процессов и ресурсов Мирового океана», № гос. рег. АААА-А19-119122090009-2

Список цитируемой литературы

1. Шакиров Р. Б., Обжиров А. И., Шакирова М. В., Мальцева Е. В. О газогидратах окраинных морей Восточной Азии: закономерности генезиса и распространения (обзор) // Геосистемы переходных зон. – 2019. – Т. 3. – № 1. – с. 65–106 <https://doi.org/10.30730/2541-8912.2018.2.4.065-106>
2. Аэрокосмический мониторинг объектов нефтегазового комплекса. Под редакцией академика В. Г. Бондура – М.: Научный мир, 2012. 558 с.: ил. + 52 с. цв. ил. ISBN 978-5-91522-316-4
3. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // J. Mol. Biol. –1961. – V. 3. – P. 208-218
4. Ramamoorthy S., Sass H., Langner H., Schumann, P., Kroppenstedt R. M., Spring, S., Overmann J., Rosenzweig R. F. *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006. – V.56 (Pt 12). – p. 2729-2736. doi:10.1099/ijs.0.63610-0

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОИНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

Жуланов А.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: биоинформатика, популяционная генетика, микросателлиты

В настоящее время анализ генетической структуры популяций немислим без компьютерной обработки данных. Целью данной работы является акцентирование внимания на тех программах и методах их использования, которые сравнительно редко упоминаются в научных публикациях, но могут оказаться полезны при подготовке таковых.

Одной из первых широко распространённых программ для вычисления множества популяционно-генетических показателей является Arlequin [1]. Несмотря на то, что программа активно развивается, далеко не все исследователи пользуются всей полнотой её возможностей. В частности, рекомендуется обратить внимание на входящий в комплект пакет Rfunctions, позволяющий наглядно визуализировать многие вычисляемые показатели. Для его использования требуется наличие R версии 3.5.x (версии выше 4.0 включительно не поддерживаются).

GenAlEx – ещё один популярный инструмент популяционно-генетического анализа, представляет собой макрос для Microsoft Excel [2].

К его несомненным достоинствам относятся простота использования, широкий набор функций и возможность экспорта данных в различных форматах. К недостаткам – необходимость приобретать лицензию на Microsoft Office и недостаточное для высокорейтинговых журналов качество получаемых иллюстраций. Автор рекомендует использовать GenAlEx только для хранения исходных данных, их преобразования во входные форматы для другого ПО, и выполнения видов анализа, не требующих визуализации результатов. Вопрос высококачественной визуализации результатов анализа (например, с помощью пакетов matplotlib [3] или ggplot2 [4], или специализированного ПО в сфере научной графики) выходит за рамки данной работы.

Для анализа и визуализации наиболее вероятного распределения изучаемых особей по генетическим кластерам широко применяется программа STRUCTURE [5]. При всех несомненных достоинствах, в последние годы все чаще встречаются критические публикации [6–8], указывающие на необходимость учитывать, как ограничения самой программы, так и необходимость тонкой настройки её параметров в зависимости от особенностей популяционной структуры изучаемых организмов. Наиболее дискуссионным моментом является достоверное определение числа выявленных генетических кластеров K , даже с использованием эмпирического показателя δK , применяемого популярным сервисом Structure Harvester [9]. Разработанная для преодоления этих трудностей программа MavericK [10] использует аналогичный STRUCTURE подход, но для определения числа кластеров применяет широко используемый в физике метод термодинамической интеграции. Как показано в работе авторов программы, данный метод на текущий момент является наиболее точным. Кроме того, возможности входящего в комплект пакета визуализации существенно превышают таковые у STRUCTURE.

Для проведения многих видов информационной обработки микросателлитных данных часто требуется матрица генетических расстояний между популяциями. Существует много подходов для вычисления таких расстояний, но, как показано в работе Гольдштейна [11], для микросателлитных маркеров наиболее достоверными оказываются расстояния, рассчитанные на основе модели пошаговых мутаций. Программа EDENetworks [12] позволяет не только вычислять и экспортировать матрицу расстояний Гольдштейна, но и строить и гибко визуализировать на её основе дерево минимальных расстояний, более наглядное и содержащее больше информации, чем обычные дендрограммы.

В связи с повышением актуальности изучения влияния климатических изменений на состояние и поведение биологических систем целесообразно включать в анализ и геоклиматические данные. Одна из наиболее полных геоклиматических баз данных WorldClim доступна по адресу <https://www.worldclim.org/data/worldclim21.html>. Для извлечения из этой базы 19 основных климатических показателей по заданным географическим координатам общепринятым подходом является использование пакета raster [13]. На основе полученных векторов строится матрица климатических дистанций путем вычисления канберрского расстояния, к примеру, с помощью модуля spatial distance известного научного пакета SciPy [14]. Анализ корреляций между матрицами генетических и климатических дистанций может выполняться в любом предназначенном для этого статистическом ПО, в том числе в GenAlEx (тест Мантелла).

Автор надеется, что приведенные в настоящей работе наблюдения и рекомендации помогут исследователям в сфере популяционной генетики расширить диапазон используемых инструментов и повысить качество будущих публикаций.

Список цитируемой литературы

1. Excoffier L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows / L. Excoffier, H.E.L. Lischer // Molecular Ecology Resources. – 2010. – Vol. 10. – P. 564-567.

2. Peakall R. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update / R. Peakall, P.E. Smouse // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – № 19. – P. 2537-2539.
3. Hunter J.D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment / J.D. Hunter // *Computing in Science & Engineering*. – 2007. – Т. 9. – № 3. – С. 90-95.
4. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis: Use R! / H. Wickham. – Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer, 2016. – 260 p.
5. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information / M.J. Hubisz [et al.] // *Molecular Ecology Resources*. – 2009. – Vol. 9. – № 5. – P. 1322-1332.
6. Puechmaile S.J. The program STRUCTURE does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem / S.J. Puechmaile // *Molecular Ecology Resources*. – 2016. – Vol. 16. – № 3. – P. 608-627.
7. The K = 2 conundrum / J.K. Janes [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2017. – Vol. 26. – № 14. – P. 3594-3602.
8. Lawson D.J. A tutorial on how not to over-interpret STRUCTURE and ADMIXTURE bar plots / D.J. Lawson, L. van Dorp, D. Falush // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 3258.
9. Earl D.A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D.A. Earl, B.M. vonHoldt // *Conservation Genetics Resources*. – 2012. – Vol. 4. – № 2. – P. 359-361.
10. Verity R. Estimating the Number of Subpopulations (K) in Structured Populations / R. Verity, R.A. Nichols // *Genetics*. – 2016. – Vol. 203. – № 4. – P. 1827-1839.
11. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci / D.B. Goldstein [et al.] // *Genetics*. – 1995. – Vol. 139. – № 1. – P. 463-471.
12. Kivelä M. EDENetworks: A user-friendly software to build and analyse networks in biogeography, ecology and population genetics / M. Kivelä, S. Arnaud-Haond, J. Saramäki // *Molecular Ecology Resources*. – 2015. – Vol. 15. – № 1. – P. 117-122.
13. Hijmans R.J. raster: Geographic Data Analysis and Modeling / R.J. Hijmans. – 2021.
14. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python / P. Virtanen [et al.] // *Nature Methods*. – 2020. – Vol. 17. – № 3. – P. 261-272.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ КОРМОВЫХ ТРАВ И ИХ ФЕНОЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

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

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

Ключевые слова: бактериальные пленки, биопленкообразование

Одним из важных факторов развития кормовой базы животноводства является использование кормовых растений, содержащих высокие концентрации витаминов, полифенолов и других биологически активных веществ. К числу таких растений, относятся эспарцет песчаный (*Onobrychis arenaria*), козлятник восточный (*Galéga orientalis*) и левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*), которые культивируются как кормовые травы в Европе, на Среднем Востоке и в восточной Африке, а также широко применяются в народной медицине и являются компонентами ряда лекарственных фармпрепаратов.

Положительное влияние растительных полифенолов на здоровье во многом определяется их взаимодействием с микробиотой организма-хозяина [1]. Полифенолы проявляют радикалсвязывающую, хелатирующую и прооксидантную активность, влияют на пути передачи сигналов, экспрессию генов и способность бактерий к образованию биопленок [2,3]. В отличие от одиночных планктонных клеток, биопленки представляют собой сообщества бактерий, прикрепленных к субстрату и погруженных в матрикс. Биопленки являются преимущественной формой существования бактерий во всех экосистемах, включая кишечник хозяина, и могут играть как положительную роль в случае бактерий-комменсалов, так и вызывать негативные эффекты при инфицировании патогенными микроорганизмами.

Существенные медицинские, а также технологические проблемы, связанные с образованием биопленок, вызваны тем, что бактерии в их составе приобретают высокую устойчивость ко всем неблагоприятным факторам, включая разнообразные стрессы, обработку антибиотиками и дезинфектантами и воздействие иммунной системы [4]. Примечательно, что, несмотря на интенсивные исследования в этой области, до сих пор не разработано каких-либо простых, эффективных и надежных методов, с помощью которых можно «химически» искоренить инфекции, связанные с образованием биопленок [5]. Одним из направлений поиска способов предотвращения образования новых и дисперсии существующих биопленок является использование отдельных полифенолов, проявляющих антимикробные свойства, или их сочетаний с антибиотиками. Однако противоречивость полученных данных (от подавления биопленкообразования до его стимуляции), зависимость эффекта от типа использованной среды, вида и дозы полифенола или растительного экстракта, указывают на необходимость дальнейших исследований [3,6,7]. Целью настоящей работы было изучение эффекта экстрактов эспарцета песчаного, козлятника восточного и левзеи сафлоровидной и их фенольных компонентов на биопленкообразование бактерий *Escherichia coli* BW25113.

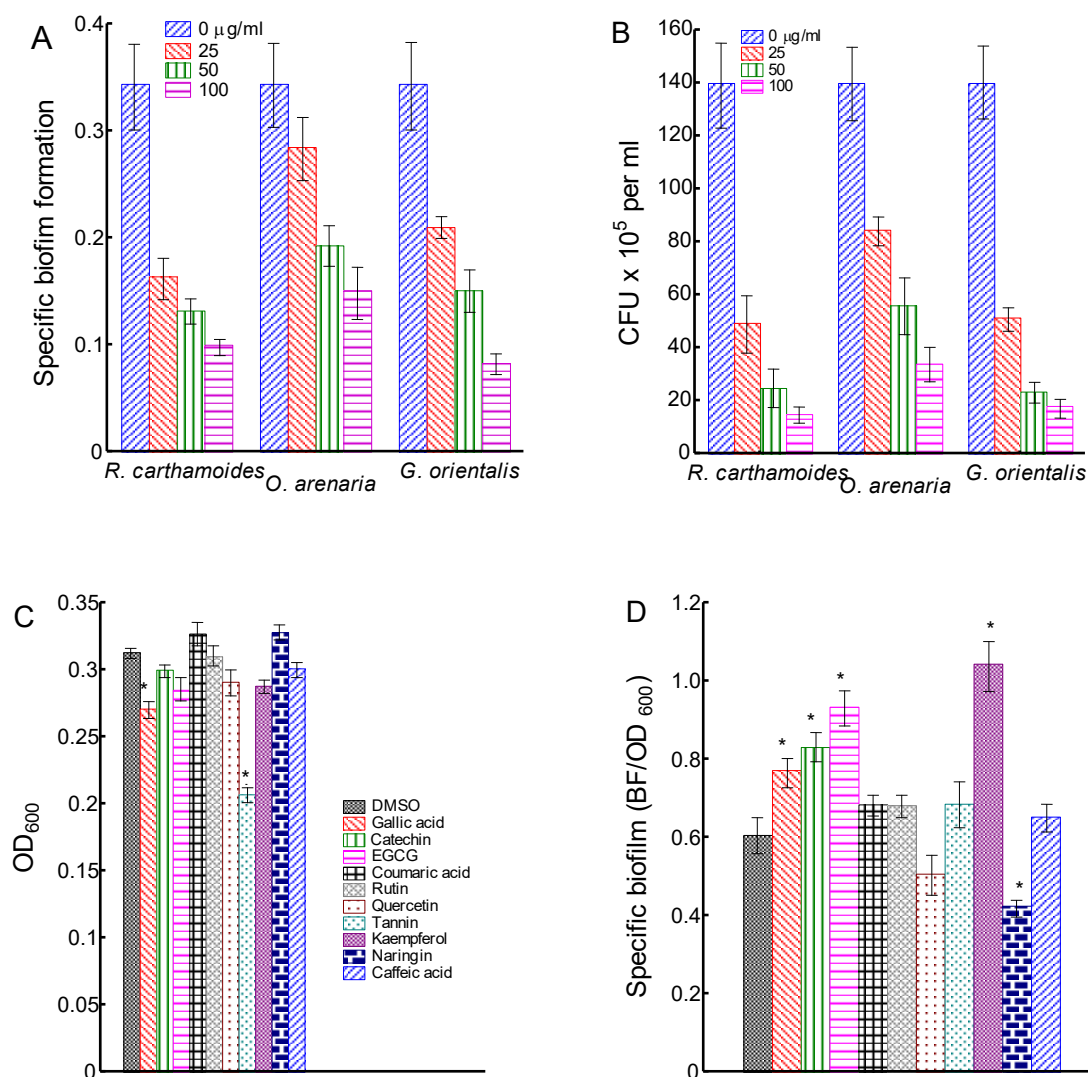
Водно-спиртовые экстракты были получены из надземной части растений, собранных в фазе бутонизации и начала цветения на опытном участке Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства ПФИЦ УрО РАН. Ночную культуру *E. coli* выращивали в термостате при 37°C на минимальной среде M9 с глюкозой (4 г/л). После центрифугирования клетки ресуспендировали в свежей среде до оптической плотности OD₆₀₀ = 0.1. Эту культуру и по 5 мкл экстрактов, отдельных полифенолов или ДМСО (контроль) переносили в 96-луночные полистирольные планшеты (200 мкл на лунку) и инкубировали в статических условиях при 37°C в течение 22 часов. Количество образовавшихся биопленок определяли путем окрашивания прикрепленных клеток генцианвиолетом, как описано ранее [3], измеряя OD₅₄₀ на микропланшетном спектрофотометре xMark™ BioRad. Число колониеобразующих единиц (КОЕ) в планктоне и биопленках подсчитывали путем посева серийных разведений культуры на чашки с LB агаром. Состав фенольных соединений, входящих в экстракты, определяли методом ВЭЖХ.

Все экстракты ингибировали рост биопленок прямо пропорционально используемой концентрации. При максимальной дозе 100 мкг/мл удельное значение биопленкообразования (SBF) снижалось в 2-4 раза (Рис. 1А). Определение КОЕ в биопленках выявило аналогичную зависимость. Экстракты не влияли на количество КОЕ в планктоне, но в 4-9 раз уменьшали КОЕ в составе биопленок (Рис. 1В).

Мы также изучили воздействие экстрактов на зрелые суточные биопленки. Добавление 100 мкг/мл экстрактов к зрелым биопленкам не вызывало их дисперсии, напротив, наблюдался небольшой дополнительный рост массы биопленок по сравнению с контролем в течение последующих суток инкубации. Это указывает на возможную роль соединений, входящих в экстракты, на ранних этапах биопленкообразования, например, путем их воздействия на редокс-чувствительные компоненты сигнальных путей. Используя данные ВЭЖХ анализа, мы изучили влияние на биопленкообразование ряда отдельных редокс-активных фенольных соединений, входящих в состав экстрактов. В число испытуемых компонентов входили галловая, таниновая, кумаровая и кофейная кислоты, катехин, эпигаллокатехингаллат,

кверцетин, рутин, кемпферол и нарингин. В концентрации 0.1 мМ эти соединения, за исключением галловой и таниновой кислот, не влияли на рост бактерий в планктоне (Рис. 1С).

Галловая и таниновая кислоты вызывали статистически значимое ингибирование роста на 13 и 34% соответственно и снижение КОЕ в планктоне и биопленках. В то же время галловая и таниновая кислоты, а также катехин, эпигаллокатехингаллат и кемпферол стимулировали образование биопленок, повышая SBF в 1.2-1.7 раза по сравнению с контролем. Нарингин ингибировал SBF на 30%. Остальные изученные соединения не оказывали статистически значимого влияния (Рис. 1D).



Влияние экстрактов и их компонентов на способность бактерий *E. coli* к формированию биопленок. А – обработка экстрактами эспарцета песчаного (*Onobrychis arenaria*), козлятника восточного (*Galéga orientalis*) и левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) (100 мкг/мл). В – влияние экстрактов на число КОЕ в биопленках. С – влияние фенольных компонентов экстрактов (0.1 мМ) на оптическую плотность OD₆₀₀. D – эффект фенольных соединений на способность *E. coli* к образованию биопленок. Звездочкой отмечены статистически значимые различия с контролем ($p < 0.05$)

Таким образом, в отличие от самих экстрактов, все изученные фенольные соединения, кроме нарингина, либо не влияли на образование биопленок, либо даже стимулировали их

образование. Причины ингибирующего действия экстрактов на биопленкообразование требуют дальнейшего изучения.

Следует отметить, что внесение экстрактов в среду способствует более длительному поддержанию роста и повышенному накоплению биомассы в планктоне по сравнению с контролем, вероятно, за счет использования некоторых компонентов экстрактов в качестве дополнительных ростовых субстратов. Возможно, эти соединения также влияют и на образование биопленок, препятствуя переходу клеток из планктона в состав биопленки. В целом, ингибирование биопленкообразования изучаемыми экстрактами может оказывать положительное влияние на микрофлору кишечника, препятствуя адгезии патогенных форм и не влияя на уже сформировавшиеся биопленки бактерий-симбионтов.

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

Список цитируемой литературы

1. 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. – № 2. – P. 78. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>
2. 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. – № 6. – P. 759-768. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.017>
3. Samoilova Z., Muzyka N., Lepekhina E., Oktyabrsky O., Smirnova G. Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in *Escherichia coli* // *Antonie van Leeuwenhoek J. of Microbiol.* – 2014. – V. 105. – № 4. – P. 709-722. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0126-3>
4. Lebeaux D., Ghigo J.-M., Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2014. V. 78. – № 3. – P. 510–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
5. Jakobsen T.H., Tolker-Nielsen T., Givskov M. Bacterial biofilm control by perturbation of bacterial signaling processes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18. – P. 1970. <https://doi.org/10.3390/ijms18091970>
6. Samoilova Z.Y., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N. Synergistic and antagonistic effects of plant extracts and antibiotics on mature *Escherichia coli* biofilms // *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* – 2019. – V. 20. – № 3-4. – P. 89-94.
7. Abreu A.C., Saavedra M.J., Simoes L.C., Simoes M. Combinatorial approaches with selected phytochemicals to increase antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus* biofilms // *Biofouling* – 2016. – V. 32. – № 9. – P. 1103–1114. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1232402>

ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ УРОПАТОГЕННЫХ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ПОЛИКЛИНИКИ И СТАЦИОНАРА

Каримова Н.В., Поспелова Ю.С., Кузнецова М.В.

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

Ключевые слова: уропатогенные *Escherichia coli* (UPEC), генетические детерминанты вирулентности, нозокомиальные штаммы.

Актуальность. Проблема инфекций мочевыводящих путей (ИМВП) актуальна для современной медицины. Этиологическая структура ИМВП определяется ведущей ролью кишечной палочки: уропатогенные штаммы *Escherichia coli* (UPEC) составляют до 90 % бактериальных культур при неосложненных ИМВП у пациентов поликлиник и 30-50 % – у людей, находящихся на стационарном лечении [1]. Существует мнение, что нозокомиальные патогены имеют большее разнообразие факторов вирулентности, чем представители аутомикробиоты пациентов поликлиник [2, 3].

Цель исследования – сравнить распространенность генов вирулентности среди штаммов UPEC, изолированных от пациентов поликлиник и стационаров.

Материалы и методы. В работе были использованы 76 штаммов *E. coli*, выделенных в условиях стационара, имеющих уникальный генетический профиль, а также 33 индивидуальных штамма UPEC, выделенных от пациентов на амбулаторном лечении. Детектировали гены адгезинов *fimH*, *usp*, *papC*, *papGII/III*, *upaG*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *flu*, *iha*, *yqi*, *ibeA*, ген протеазы *ompT*, гены токсинов *cnfI* и *hlyA*, а также ген системы захвата и транспорта железа *iroN* [5, 6].

Результаты. Самыми распространенными в группе поликлинических штаммов были гены белков адгезии *fimH* (75%) и *flu* (66%), уроспецифичного фимбриального белка *papGII* (48%), а также *iha* (гомолог адгезина Igr), участвующий в колонизации мочевого пузыря и почек (39%).

Самыми редкими генами оказались *ibeA* (3%) и *papGIII* (9%). В группе стационарных штаммов самым распространенными генами были *fimH* (91%) и *flu* (61%), а также уроспецифичный ген *usp* (45%), интересно, что в достаточно большом проценте (39%) был представлен ген *yqi*, впервые описанный для группы птичьих патогенных *E. coli*, кроме того, в 33% был обнаружен ген инвазина *ibeA*, характерный для группы диареогенных *E. coli*. Реже всего встречались *afa/draBC* (8%), *upaG* (14%) и *papGII* (16%).

Сравнительный анализ распространенности детерминант вирулентности выявил различия среди двух групп штаммов. Достоверно чаще (согласно *F*-test) у стационарных культур детектировали гены *fimH* ($p=0,04$), *ibeA* ($p<0,01$), *usp* ($p<0,01$), *papGIII* ($p=0,01$), *yqi* ($p=0,02$). Кроме того, в стационаре также был выше процент встречаемости *iroN*, *sfaDE* и *ompT*. Частота обнаружения штаммов, несущих 5 и более детерминант вирулентности составила 44,8% для поликлинических UPEC и 52,6% – для стационарных, что свидетельствует о более высоком вирулентном потенциале последней группы.

Заключение. Распространенность генетических детерминант вирулентности среди штаммов UPEC варьирует в широких пределах. В группе стационарных культур исследуемые гены детектировались значительно чаще, чем в поликлинических штаммах. Кроме того, в условиях стационара *E. coli* имели более сложные паттерны генов вирулентности. Полученные данные подтверждают возможность концентрирования высоковирулентных штаммов в отделениях стационаров.

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

Список цитируемой литературы

1. Wiles T.J., Kulesus R.R., Mulvey M.A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* // Exp. Mol. Pathol. – 2008. – V. 5. – P. 11-19.
2. de Souza G.M., Neto E.R.D.S., da Silva A.M., de Souza Iacia M.V.M., Rodrigues M.V.P., Pereira V.C., Winkelstroter L.K. Comparative study of genetic diversity, virulence genotype, biofilm formation and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from nosocomial and community acquired urinary tract infection // Infect. Drug Resist. – 2019. – V. 12. – P. 3595-3606.
3. Hassuna N.A., Khairalla A.S., Farahat E.M., Hammad A.M., Abdel-Fatta M. Molecular characterization of Extended-spectrum β lactamase producing *E. coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt // Sci. Rep. – 2020. – V. 10: 2772.

4. Казанцев А.В., Осина Н.А., Глинская Т.О., Кошелева О.Н., Максимов Ю.В., Девдариани З.Л., Микеров А.Н. Факторы вирулентности и филогенетическая характеристика уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных на территории г. Саратова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – №4. – Р. 56-60.
5. Rezaatofghi S.E., Mirzarazi M., Salehi M. Virulence genes and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infection and uninfected control subjects: a case control study // BMC Infect. Dis. – 2021. – V. 21: 361.

СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ ЗЕМЛЯНИКИ ЛЕСНОЙ В КУНГУРСКОМ РАЙОНЕ

Кокшарова А.Н., Данилова М.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: земляника лесная, семенная продуктивность, популяция

Земляника лесная (*Fragaria vesca* L.) – многолетнее травянистое растение из семейства Розовые (*Rosaceae*). Земляника лесная является пищевым продуктом, используется в селекции данного рода, а также в качестве лекарственного сырья [1, 2]. Изучение репродуктивной биологии разных видов является необходимым условием в системе разработки эффективных способов их охраны и рационального использования. Определение потенциальной и реальной семенной продуктивности позволяет охарактеризовать репродуктивные возможности вида, способность к самовоспроизведению в природной популяции.

Популяция Земляники лесной преимущественно состоит из 2-летних кустов – розеточных побегов, высота одного куста колеблется от 5 до 30 см, обычно во второй половине лета формируются наземные столоны-усы, на концах которых развиваются новые кусты, которые в первый год не цветут. Сходным ареалом обладает близкий вид Земляника зеленая (*Fragaria viridis* Weston), на опушках можно встретить смешанные популяции этих видов. Оба вида хорошо различаются по цветкам и плодам, вегетативные части различить сложнее. В частности, края листьев обоих видов с крупными острыми зубцами, но верхний зубец конечного листочка у Земляники лесной равен боковым или чуть крупнее их [3, 4]. Несмотря на то, что гибридизация между обоими видами известна и даже использовалась в селекции этого рода в 19 веке [1], данных о спонтанной гибридизации в литературе не найдено, что может быть связано с тем, что для Земляники лесной отмечают низкую всхожесть производимых семян, по большей части для этого вида свойственно вегетативное размножение [5]. Цветки *Fragaria vesca* мелкие, чаще менее 1 см в диаметре. Чашелистики при плодах горизонтально оттопыренные. Зрелые плоды легко отделяются от цветоложа, ярко-красные [6]. Для вида характерен однократный тип плодоношения в течение одного вегетативного периода [3]. В нашем исследовании видовая принадлежность растения определялась по комплексу признаков, гибриды не были отмечены, либо отсутствовали в изученных популяциях, либо не имели достаточных морфологических отличий от исходных видов.

Цель работы – определение семенной продуктивности растений земляники лесной, произрастающих в лесном фитоценозе.

Исследование проводили в 2021 г. Для изучения были выбраны две популяции Земляники лесной на территории Кунгурского района. Первая популяция на территории Ледяной горы в черте г. Кунгур, в лесу с преобладанием лиственницы в I древесном ярусе, рябины и ирги во II древесном ярусе, и малины в кустарниковом ярусе. Вторая популяция располагалась в 10 км от первой, в юго-западном направлении, в лесу с преобладанием березы в I древесном ярусе, сосны во II древесном ярусе, и ирги в кустарниковом ярусе.

Массовое цветение Земляники лесной длилось с 21.05.21 по 12.06.21. Всего в генеративное состояние в первой популяции перешло в среднем 25% всех кустов. Во второй популяции – 17%. Цветки в соцветии распускались поочередно. Начало плодоношения и образование завязи в обеих популяциях происходило на 13-17 день от начала цветения. В первой популяции было 2 участка, где преобладала земляника зеленая, на этих участках не было цветения и плодоношения земляники лесной, она встречалась там исключительно в вегетативном состоянии.

Для изучения семенной продуктивности были собраны цветки и плоды. В собранных цветках подсчитывалось количество пестиков, а на плодах – орешков. Проведен статистический анализ полученных данных, для каждой популяции для таких показателей как число пестиков на один цветок, число орешков на один плод, цветков и плодов на один куст. Показателем потенциальной семенной продуктивности было принято число зачатков (пестиков) на особь, а фактической семенной продуктивности – число реально образовавшихся орешков на каждой особи за одно поколение [7]. Статистическая обработка проводилась при помощи компьютерной программы «Microsoft Excel».

В обеих популяциях чаще всего встречались кусты, образующие по 1-2 цветка. Пик цветения пришелся на 3-8 июля. Результаты изучения семенной продуктивности двух популяций представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Потенциальная семенная продуктивность

Популяция	Число изученных цветков, шт	Мода	Число семязачатков в завязи (ПСП цветка), шт.			
			min–max	Сред. значение	σ	V
1	38	70-80	39-108	71 ± 3	17,5	0,246017
2	48	55-65	36-82	56 ± 2	11,9	0,211799

Таблица 2 – Фактическая семенная продуктивность орешков на плод

Популяция	Число изученных цветков, шт	Мода	Число семязачатков в завязи (ПСП цветка), шт.			
			min–max	Сред. значение	σ	V
1	38	70-80	38-131	81 ± 3	18,3	0,226564
2	44	55-65	29-105	64 ± 3	16,5	0,258400

В обеих популяциях в среднем образовывалось по 1-2 плода. Среднее значение орешков на плод отличается по двум популяциям, а также цветков и плодов в первой популяции меньше, но больше среднее число пестиков и орешков. Для оценки статистической достоверности отличия друг от друга популяций использовали метод расчета по Стьюденту. Значение t-критерия по Стьюденту меньше критического ($0,0243 < 1,9901$). Это говорит о том, что различия между популяциями статистически не значимы. Семенная продуктивность оказалась сходной для обеих популяций.

Список цитируемой литературы

1. Staudt, G., Dimeglio, L. M., Davis, T. M. & Gerstberger, P.: *Fragaria ×bifera* Duch.: Origin and taxonomy. – Bot. Jahrb. Syst. 125: 53–72. 2003. – ISSN 0006-8152.
2. Государственная фармакопея РФ XIV издание: Лекарственное растительное сырье. – 2018. – Т. 4. – С. 5188–7019.
3. Жукова Л.А. Онтогенез земляники лесной. Онтогенетический атлас лекарственных растений (Под ред. Л.А. Жуковой). Йошкар–Ола, 1997; 239 с. 196–201 с.

4. Шивцова И.В. Эколого-морфологические особенности особей и организация популяций *Fragaria vesca* L.: Автореф. дис. канд. биол. наук. Сыктывкар, 2008. 23 с.
5. Munger, Gregory T. 2006. *Fragaria vesca*. In: Fire Effects Information System, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). Available: <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/forb/fraves/all.html> [2021, October 15].
6. Дикорастущие лекарственные растения Урала: учеб. пособие / Е. С. Васфилова, А.С. Третьякова и др. // под общ. ред. В. А. Мухина; М-во образования и науки Рос. Федерации, Урал. Федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. – 204 с.: цв. ил.
7. Курдюкова О.Н., Конопля Н.И. Семенная продуктивность и семена сорных растений. Монография. – СПб.: Свое издательство, 2018. – 200 с.

СИЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ, ОЦЕНЕННЫЕ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

Коньшев И.В.^{1,2}, Ананченко Б.А.², Бывалов А.А.^{1,2}

¹ Вятский государственный университет, Киров, Россия

² Институт физиологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Ключевые слова: бактерия, *Yersinia pseudotuberculosis*, моноклональные антитела, лазерная ловушка

Введение. Род *Yersinia* включает три патогенных для человека вида бактерий – *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Первый из них является возбудителем тяжёлого системного заболевания. Возбудители двух других видов являются энтеропатогенами и вызывают заболевания, характеризующиеся иной клинической картиной и гораздо меньшей эпидемической опасностью. Вместе с тем, в последние десятилетия заболеваемость псевдотуберкулезом и кишечным иерсиниозом людей в виде вспышек или спорадических случаев регистрируется несравненно чаще [1].

Одним из значимых направлений исследований иммуногенеза в инфекционной медицине является изучение молекулярных основ взаимодействия бактериальной клетки, отдельных ее поверхностных антигенов с антителами, расположенными как изолированно, так и связанными с клетками иммунной системы макроорганизма. Эффективным подходом к количественному определению силы взаимодействий подобного рода служит применение биофизических подходов, в том числе метода оптической ловушки. С этих позиций возбудители рода *Yersinia* практически не изучены.

Основная цель настоящей работы состояла в количественной оценке силовых характеристик взаимодействия цельных клеток *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* с моноклональными антителами различной специфичности методом оптической ловушки.

Материалы и методы. Культуры иерсиний выращивали на плотной питательной среде на основе питательного агара “Биотехновация” (БТН-агар, Россия): *Y. pseudotuberculosis* при температуре 10 °С, способствующей продукции О-боковых цепей, в течение 10 сут, *Y. pestis* – при температуре 27°С в течение 2 сут. Микробные клетки инактивировали 0.5% ным формальдегидом в течение 5 сут, после чего пятикратно отмывали фосфатным буферным раствором (ФБР). Чашки «Fluorodish» (Tokio Bocke, Япония) диаметром 35 мм со стеклянным дном выдерживали в течение 1.5 ч в атмосфере чистого аргона в парах триэтиламина (Рехим, Россия) и 3-аминопропилтриэтоксисилана (Sigma Aldrich, США) в их объемном соотношении 1:3.

По окончании инкубации на поверхность стекла чашек наносили последовательно 30 мкл 0.46%-ного раствора N-гидроксисукцинимид (Sigma Aldrich, США) в ФБР, затем 900 мкл ФБР, 0.6 мкл неразведенного N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид (Sigma Aldrich, США) и 100 мкл препаратов мышинных антител МКАт2 (комплементарны О-боковым цепям ЛПС-10) [2] или МКАт7 (комплементарны белковому эпитопу наружной мембраны иерсиний) [3] (~2.7 мг/ мл). Тщательно перемешивали содержимое чашек, выдерживали их в течение 18 часов при температуре +4°C, после чего пятикратно промывали стерильным ФБР, затем пятикратно водой «Millipore». Далее они обозначены как «МКАт2» и «МКАт7». В качестве контрольных образцов использовали чашки, обработанные бычьим сывороточным альбумином (БСА) и АРТЕS – далее они обозначены «БСА» и «АРТЕS».

В работе использован оптический лазерный пинцет «JPK Nanotracker» (JPK, Германия) на базе инвертированного микроскопа «Nikon» (x60, NA = 1.2) с длиной волны лазера 1064 нм. Микробную клетку захватывали с помощью оптической ловушки на расстоянии 2-3 мкм от поверхности дна чашки, после чего ее подводили по оси Z к микробной клетке на расстояние не более 1.0 – 1.5 мкм. Далее пьезостолик с чашкой перемещали к фокусу луча с захваченной микробной клеткой с шагом 20 нм до начала нарастания вольтажного сигнала, свидетельствующего о контакте двух объектов. Через 2-3 шага после первого приращения сигнала пьезостолик останавливали и через 1 сек отводили его в обратном направлении в ручном режиме с приблизительной скоростью 150 нм/с. Вольтажный сигнал пересчитывали в единицы силы (пН) на основе коэффициентов жесткости (~0.20 пН/ нм) и чувствительности (~6.4 В/ м), определенных в результате предварительно проведенной калибровки с использованием микросфер диаметром 1 мкм (Polyscience Beads, USA) [4].

Результаты и обсуждение. Результаты обработки экспериментальных данных количественной оценки адгезивности бактериальных клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b и *Y. pestis* EV к разнокачественно функционализированным стеклянным подложкам представлены в виде средних сил отрыва (Таблица).

Адгезивность бактериальных клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b и *Y. pestis* EV

Микробные клетки	Средняя сила отрыва для чашек, обработанных			
	МКАт2	МКАт7	БСА	АРТЕS
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1b	5.86 ± 3.31 (n = 244)	2.00 ± 1.77 (n = 66)	1.97 ± 1.33 (n = 68)	2.35 ± 1.66 (n = 66)
<i>Y. pestis</i> EV	4.20 ± 2.93 (n = 217)	9.60 ± 4.86 (n = 216)	4.62 ± 5.16 (n = 104)	6.20 ± 4.19 (n = 248)

Как видно, среднее значение сил отрыва клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b от стекла, функционализированного препаратом МКАт2, оказалось существенно ($p > 0.99$) выше по сравнению с таковым для «МКАт7». При этом значение средней силы отрыва для системы *Y. pseudotuberculosis* 1b – «МКАт7» практически не отличалось от этого показателя для контрольных стекол, покрытых БСА и АРТЕS.

Иная картина наблюдалась при сравнении взаимодействующих объектов на основе клеток *Y. pestis* EV: сила отрыва клеток от стеклянной подложки, функционализированной МКАт7, напротив, оказалась достоверно ($p > 0.99$) выше сравнительно с чашками «МКАт2» и «БСА».

Совокупность представленных данных однозначно указывает на наличие достаточно выраженной специфической составляющей в исследуемых взаимодействиях. Так, клетки психрофильного возбудителя *Y. pseudotuberculosis* 1b при низких температурах культивирования продуцируют повышенное количество поверхностно расположенного О-антигена липополисахарида (ЛПС) [5] и поэтому достаточно прочно связываются с комплементарными антителами МКАт2. С другой стороны, бактерии *Y. pestis* EV не способны

к биосинтезу О-боковых цепей [6], которые могли бы пространственно экранировать антигенные эпитопы, один из которых, белковый эпитоп наружной мембраны, специфически распознается антителами МКАт7 [3].

Обращает на себя внимание, в целом, более низкие значения показателей силы взаимодействия в системах с участием бактерий *Y. pseudotuberculosis* 1b по сравнению с *Y. pestis* EV. По-видимому, это связано с большими гидрофобностью и электроотрицательным зарядом клеток *Y. pestis* EV сравнительно с клетками *Y. pseudotuberculosis* 1b. И то и другое может объясняться наличием на поверхности последних выраженного слоя гидрофильных О-боковых цепей, ослабляющего неспецифическое связывание клеток с подложкой («МКАт7, «BSA», «APTES») и снижающего интегральную силу отрывов, включающих специфическую составляющую (чашки «МКАт2»).

Список цитируемой литературы

1. Quintard B., Petit T., Ruvoen N., Carniel E., Demeure C.E. Efficacy of an oral vaccine for veterinary use against pseudotuberculosis // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2010. Vol. 33, e59 – e65.
2. Byvalov A.A., Dudina L.G., Litvinets S.G., Novikova O.D., Khomenko V.A., Portnyagina O.Yu., Ovodov Yu.S. Study of *Yersinia Pseudotuberculosis* Surface Antigen Epitopes Using Monoclonal Antibodies // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2014. – V. 50. – №2. – P. 179–186.
3. Byvalov A.A., Dudina L.G., Chernyad'ev A.V., Konyshchev I.V., Litvinets S.G., Ovodov Yu.S. Immunochemical Activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* B-Antigen // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2015. – V. 30. – №2. – P. 93–100.
4. Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshchev I.V. Single-Cell Force Spectroscopy of Interaction of Lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* with J774 Macrophage Membrane Using Optical Tweezers // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2018. – V. 12. – №2. – P. 93–106.
5. Skurnik M. Molecular genetics, biochemistry and biological role of *Yersinia* lipopolysaccharide // *Adv Exp Med Biol*. – 2003. – V. 529. – P. 187–197.
6. Skurnik M., Peippo A., Ervela E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b // *Mol. Microbiol*. – 2000. – V. 37. – P. 316–330.

КЛОНАЛЬНАЯ И ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ В ООПТ «ЗАКАМСКИЙ БОР» Г. ПЕРМЬ

Корниенко Т.В., Малышева В.А., Данилова М.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: черника, популяция, клональная структура, онтогенез

Черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.) широко распространена в Пермском крае. Это медоносное, дубильное, лекарственное растение, плоды которого также употребляются в пищу. *V. myrtillus* выполняет важную трофическую роль в растительных сообществах [1, 2].

Согласно исследованиям разных лет, у многих представителей рода Вакциниум затруднено семенное размножение, в том числе, у черники. Ценопопуляции черники обыкновенной состоят преимущественно из парциальных кустов, соединяющихся между собой корневищами [3, 4, 5]. Из данных работ видно, что вегетативное размножение широко распространено в природных популяциях черники и, по некоторым данным, преобладает над семенным [6].

Высокая семенная продуктивность отдельных популяций не является гарантией успешного семенного размножения черники [7]. Преобладание вегетативного размножения ведет к накоплению неблагоприятных мутаций, которые нарушают процессы цветения и плодоношения и приводят к стерильности отдельных популяций, которые поддерживаются исключительно с помощью вегетативного размножения [8, 9].

Из-за особенностей размножения черника, как и многие другие вегетативно-подвижные виды, является сложным объектом для оценки репродуктивного потенциала популяции и ее генетической изменчивости, ее способности адаптироваться к изменяющимся условиям среды, моделирования динамики популяции.

На территории ООПТ «Закамский бор» нами был проведен подсчет всех клонов на тринадцати пробных площадках. Для нашего исследования нам необходимо было, как можно точнее определить границы клонов, но определение было затруднено тем, что со временем старые участки корневища могут отмирать, также корневища могли быть повреждены во время их извлечения. Длина корневища у одного клона на пробных площадках могла достигать двух метров, согласно литературным данным, длина корневища может достигать трех метров [3]. Количество клонов в среднем равно $6,5 \pm 2,1$ на 1 м^2 с коэффициентом вариации 32,8%. Количество парциальных кустов в одном клоне $5,1 \pm 2,9$ коэффициент вариации при этом составляет 55,4% (Таблица 1), что говорит нам о большой вариабельности в клональной структуре ценопопуляций. Полученное значение t-критерия Стьюдента меньше критического ($0,318 < 2,306$). Это означает, что различия сравниваемых величин между ценопопуляциями статистически не значимы, и вариабельность признака является стабильной для популяции в целом.

Таблица 1 – Клональная структура популяции черники

	Количество клонов на пробной площадке	Количество парциальных кустов в клоне
Максимальное значение	10	11
Минимальное значение	3	2
Среднее значение, $M \pm m$	$6,5 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,6$
Коэффициент вариации, cv %	32,8	55,4

Единичных особей в ценопопуляциях не обнаружено, так же не обнаружено проростков. Средний возраст для начала формирования рамет у черники определен в 61 месяц вегетации, что соответствует примерно 10 реальным годам [10]. Таким образом, факт отсутствия проростков и единичных взрослых особей не исключает полностью возможность семенного размножения в популяции, но указывает на то, что как минимум в последние 10 лет успешного семенного размножения на изученных площадках не происходило.

При изучении популяции структуры популяции черники было обнаружено 7 онтогенетических состояний парциальных кустов: ювенильное (j), виргинильное (v), молодое генеративное (g1), зрелое генеративное (g2), старое генеративное (g3), субсенильное (ss) и сенильное (s). Данные о количественном распределении особей по онтогенетическим состояниям приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение особей по онтогенетическим состояниям

Параметры	Онтогенетические состояния						
	j	v	g1	g2	g3	ss	s
Количество, шт.	17	64	38	78	34	16	10
Соотношение, %	6,6	24,9	14,8	30,4	13,2	6,2	3,9

В популяции черники на территории ООПТ «Сосновый бор» основная роль принадлежит генеративным особям. Число молодых генеративных, генеративных и зрелых генеративных особей составляет более 58%. Для оценки возрастной структуры популяции черники на территории ООПТ «Сосновый бор» рассчитаны индексы «дельта-омега». Величины индексов возрастности (Δ) и эффективности (ω) популяции составили, соответственно, 0,4110 и 0,6663. По типу популяция относится к переходным, однако ее значение $\omega=0,6663$ очень близко к границе «молодая – зреющая». Высокое значение индекса эффективности свидетельствует также о достаточно хорошем и устойчивом состоянии популяции.

Список цитируемой литературы

1. Егошина Т.Л., Егорова Н.Ю., Лугинина Е.А., Оботнин С.И., Ярославцев А.В., Гудовских Ю.В., Кислицына А.В., Капустина Н.В., Сулейманова В.Н. Значение дикорастущих ягодников в питании охотничьих животных // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2017. Т. 19, № 2-2. С. 255–260.
2. Кислицына А.В. Фитоценотическая и продукционная характеристика *Vaccinium myrtillus* L. в лесных сообществах южно-таежной подзоны Кировской области // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: Мат. XII Всерос. науч.-практ. конф. с международн. участием. Книга 2. Киров: ВятГУ, 2017. С. 87–90.
3. Серебряков И.Г., Чернышова М.Б. Морфогенез жизненной формы кустарничка у черники, брусники и других болотных Ericaceae // Бюлл. МОИП, отд. биол. 1955. Т. 60, вып.2. С. 35-52.
4. Мазуренко М.Т. Вересковые кустарнички Дальнего Востока (Структура и морфогенез). М.: Наука, 1982. 184 с.
5. Шутов В.В., Смирнов А.Н. Опыт анализа возрастного состава побегов ценопопуляций *Vaccinium uliginosum* L. в Костромской области // Растительные ресурсы. 1991. Т. 27, вып. 1. С. 43–52.
6. Синская Е.Н., Щенкова М.С. К вопросу о полиморфизме некоторых видов *Vaccinium* // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1928. Т. 18. Вып. 4. С. 185-222.
7. Лузянина О.В. Проявление несовместимости у брусничных // Генетические источники лекарственных и ароматических растений. М., 2001. С. 293–297.
8. Eckert C.G. The loss of sex in clonal plants // Evol. Ecol. 2002. Vol. 15. P. 501–520.
9. Кутлунина Н.А., Зимницкая С.А., Жеребцова М.И. Процессы стерилизации в популяциях вегетативно подвижных растений // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века: материалы Всерос. конф. Петрозаводск, 2008. Ч. 1. С. 275–277.
10. Комаров А.С., Зубкова Е.В., Фролов П.В. Клеточно-автоматная модель динамики популяций и сообществ кустарничков // Сибирский лесной журнал. 2015. № 3. С. 57 – 69.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСМОПРОТЕКТОРЫ У РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ВТОРИЧНОГО ЗАСОЛЕНИЯ СРЕДЫ

Куприна А.С., Четина О.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: солеустойчивость, флавоноиды, осмопротекторы

Воздействие Березниковско-Соликамского промышленного узла на окружающую среду выражается в засолении почв, поверхностных и подземных вод [1]. На техногенно-засоленных почвах происходит смена растительных сообществ на более устойчивые, что приводит к трансформации зональных ландшафтов в целом.

Интенсивное засоление негативно влияет на протекание всех основных физиологических процессов у растений [2]. Накопление солей в почвах в свою очередь может сопровождаться увеличением щелочности [1], при этом природные почвы Пермского края имеют кислую и нейтральную реакцию среды. Для большинства растений требуется среда, близкая к pH 6,5. Поэтому, и кислотный, и щелочной уровень pH корневой среды изменяет pH клеток и тканей. Уровень pH среды существенно влияет на фотосинтез, генерацию активных форм кислорода и усиление перекисного окисления липидов, проницаемость мембран и т.д. [3].

В адаптации растений к различным природным и антропогенным факторам значительная роль принадлежит низкомолекулярным протекторным соединениям (фенольным соединениям, органическим кислотам, растворимым сахарам, каротиноидам и др.) [4]. Глицин-бетаин является нетоксичным клеточным осмолитом, который повышает осмолярность клетки в период стресса, таким образом, он играет важную роль в смягчении стресса защищая клетку осмотической регулировкой, стабилизируя белки, защищая фотосинтетический аппарат от стрессовых повреждений и снижая АФК [5]. Флавоноиды в неблагоприятных условиях в растениях выполняют защитную роль, благодаря химической природе они способны вступать в реакции перекисного окисления [6].

Целью нашего исследования явилось изучение содержания некоторых низкомолекулярных осмопротекторов у растений в условиях вторичного засоления среды.

Почвенные и растительные образцы отобраны в пойме р. Быгель, вблизи солеотвала БКПРУ-4 (г. Березники Пермского края). Всего 22 почвенных образца корнеобитаемого слоя (0-15 см) и 6 видов растений: ситник жабий (*Juncus bufonius* L.), лебеда раскидистая (*Atriplex patula* L.), марь сизая (*Chenopodium glaucum* L.), бескильница расставленная (*Puccinellia distans* P.), вейник наземный (*Calamagrostis epigejos* L.), осот полевой (*Sonchus arvensis* L.).

В отобранных образцах почв определяли pH_{вод}, pH_{сол} – потенциометрическим методом (ГОСТ 26423-85); Na⁺ – методом пламенной фотометрии, Cl⁻ – аргентометрическим методом по мору. В растительных образцах содержание флавоноидов определяли методом спектрофотометрии, глицин бетаин – спектрофотометрически по методу Grieve и Grattan. Проведенные исследования показали, что уровень pH_{вод} корнеобитаемого слоя менялся в пределах от 3,7 до 8,6 (рис. 1).

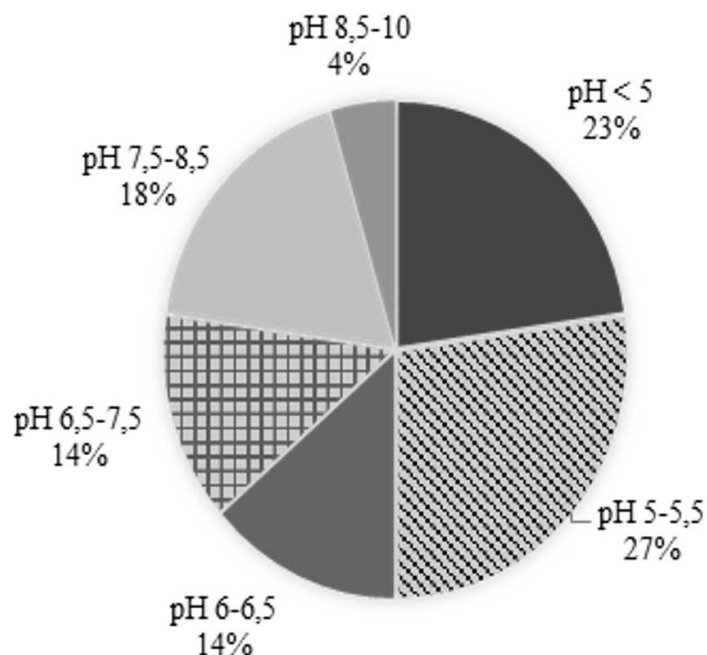


Рисунок 1 – Соотношение количества почвенных образцов по уровню pH_{вод}, %

Половина образцов имели уровень pH резкокислый и сильнокислый, примерно равное количество образцов имели слабокислый, нейтральный и слабощелочной уровень pH. Сильнощелочная среда отмечена у одного образца.

Поскольку натрий является щелочегенным ионом, то в природе отсутствуют засоленные кислые почвы. Сочетание натриевого засоления и кислой реакции среды свидетельствует о природно-техногенных процессах функционирования вторичного солончака. Повышенная кислотность может быть связана с обменным вытеснением H^+ и Al^{3+} в почвенный раствор [7, 8].

Содержание подвижного натрия в почвенных образцах варьирует в диапазоне 417,7-3746,1 мг/кг. Избыток обменного натрия может привести к набуханию и (или) распылению почвы, что создает ряд трудностей для инфильтрации воды в почву, аэрации и проникновения корней, снижает способность растений адсорбировать из почвенного раствора влагу [9].

Содержание хлора колеблется в пределах 37,5-3636 мг-экв на 100 г. почвы. Избыточное поступление хлора в растения оказывает на них фитотоксическое действие, проявляющееся в замедлении роста и развития, отмирании тканей и целых органов, а зачастую – полной гибели растения [10]. Исследуемые растения, произрастающие в условиях техногенного засоления, отличались по содержанию глицин бетаина (рис 2).

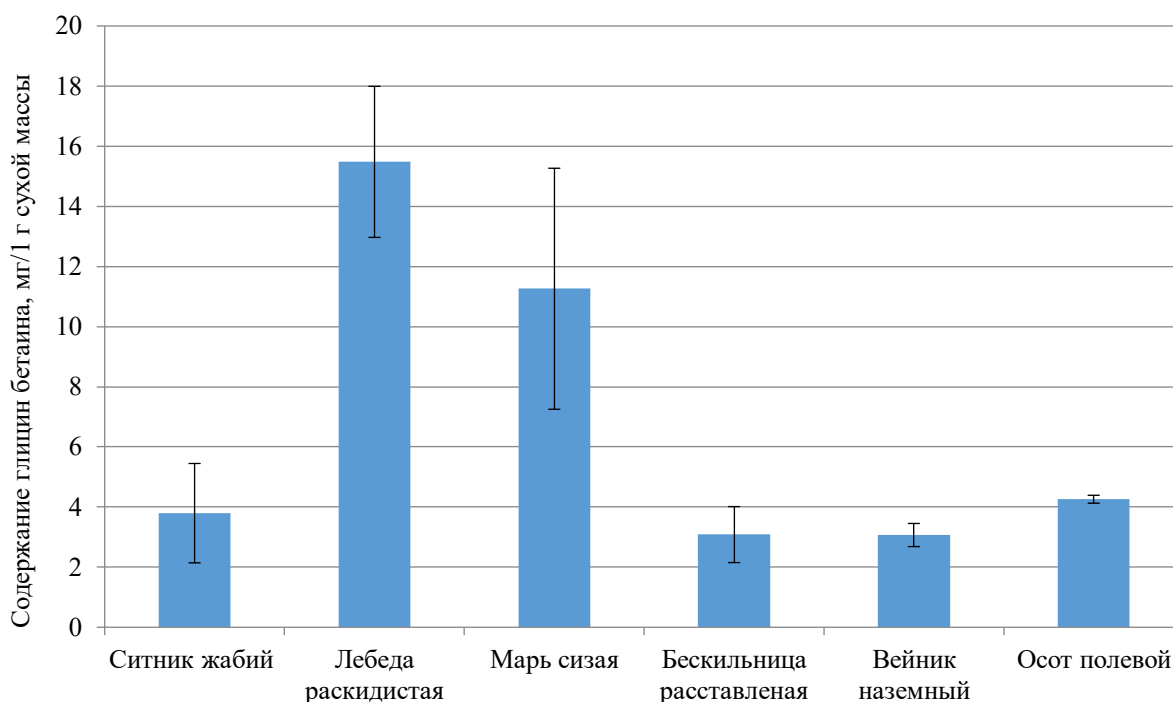


Рисунок 2 – Содержание глицин бетаина в листьях исследуемых растений

Значительное количество глицин бетаина зафиксировано у лебеды раскидистой и мари сизой – 15,48 и 11,26 мг/ 1 г сухой массы соответственно. В адаптации данных видов, по-видимому, глицин-бетаин, играет значительную роль, повышая солеустойчивость. У остальных растений содержание глицин бетаина варьировало в диапазоне 3,08- 4,26 мг/ 1 г. сухой массы.

Высоким содержанием флавоноидов в надземных органах отличились лебеда раскидистая (0,451 %) и марь сизая (0,413%) (рис. 3). Минимальный уровень флавоноидов зафиксирован у бескильницы расставленной (0,081%). В корнях высокое содержание флавоноидов отмечено у бескильницы расставленной, вейника наземного и осота полевого (в диапазоне 0,125-0,187%). Наименьшее содержание флавоноидов в подземных органах было зафиксировано у лебеды раскидистой и мари сизой – 0,30% и 0,26% соответственно. Повышенное содержание флавоноидов, характерное для лебеды и мари свидетельствует об активном участии флавоноидов в адаптации к условиям засоления.

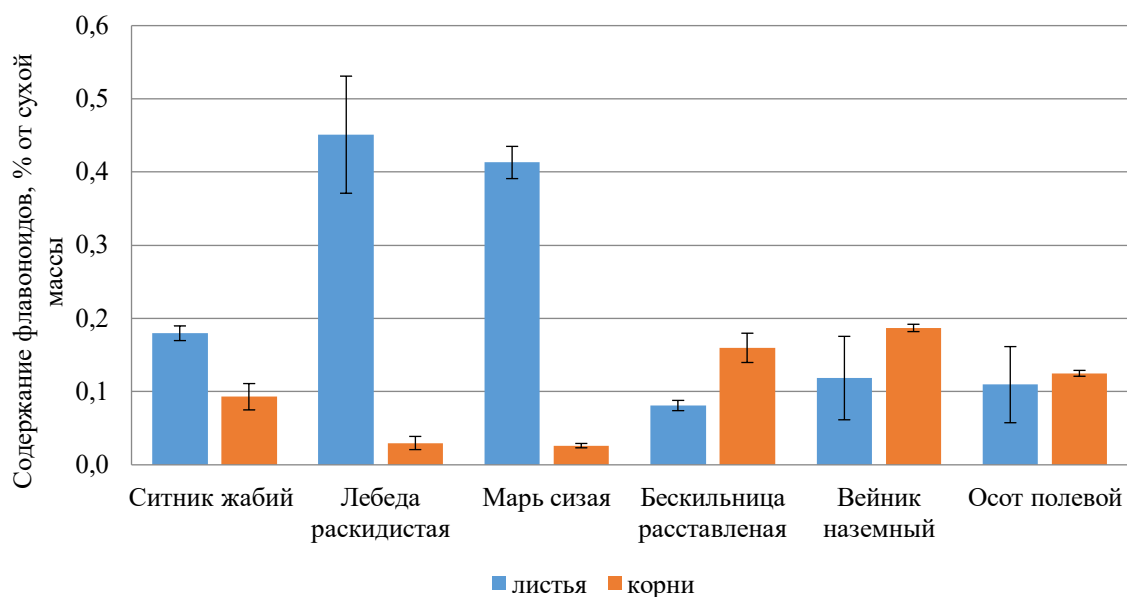


Рисунок 3 – Содержание флавоноидов в листьях и корнях исследуемых растений

Таким образом, наши исследования показали, что растения, произрастающие в условиях техногенного засоления, отличались содержанием глицин бетаина и флавоноидов. Накопление этих соединений в листьях лебеда раскидистой и мари сизой, по-видимому, играет значительную роль в адаптации, повышая солеустойчивость этих видов. Об активном участии в адаптации к условиям засоления свидетельствует также повышенное содержание флавоноидов в корнях соленепроницаемых бескильницы расставленной и вейника наземного.

Список цитируемой литературы

1. Никитин В. С. Методика расчета доз известковых удобрений / В. С. Никитин, Д. А. Благов, В. Б. Любченко // Техника и оборудование для села. – 2018. – № 9. – С. 40-42.
2. Ерёмченко О.З. Е Техногенные поверхностные образования зоны солеотвалов и адаптация к ним растений: монография / О.З. Ерёмченко [и др.] // Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2013. – С.148.
3. Четина О. А., Устинова К. И. Некоторые морфометрические параметры *Avena sativa* и содержание в нем пролина при засолении NaCl на фоне кислой и щелочной реакции почвенной среды // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2019. – №. 3. – С. 345-352.
4. Bhuyan M.H.M.B., Hasanuzzaman M., Mahmud J.A., Hossain M., Bhuiyan T.F., Fujita M. Unraveling Morphophysiological and Biochemical Responses of *Triticum aestivum* L. to Extreme pH: Coordinated Actions of Antioxidant Defense and Glyoxalase Systems // Plants. 2019. Vol. 8, № 1. P. 24.
5. Гуцалова, А. А. Механизм толерантности растений к засолению: физиологическая, биохимическая и молекулярная характеристика // Методы и технологии в селекции растений и растениеводстве: Материалы VII Международной научно-практической конференции, Киров, 04–05 апреля 2021 года / Под общей редакцией И.А. Устюжанина. – Киров: Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, 2021. – С. 65-69.
6. Aslam R., Bostan N., Nabgha-e-Amen M.M., Safdar W.A critical review on halophytes: salt tolerant plants // J. Medical Plant Res. 2011. V. 5. P. 7108.
7. Ерёмченко О.З., Митракова Н.В., Шестаков И.Е. Природно-техногенная организация почвенного покрова территории воздействия солеотвалов и шламохранилищ в Соликамско-Березниковском экономическом районе // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2017. Вып. 3. С. 311–320.

8. Еремченко О.З., Пахоруков И.В., Шестаков И.Е. Развитие солончакового процесса в почвах долин малых рек таежно-лесной зоны в связи с производством калийных солей// Почвоведение, 2020. № 4. С. 483–494.
9. Бреслер, Э. Солончаки и солонцы. Принципы, динамика, моделирование / Э. Бреслер, Б. Л. Макнил, Д. Л. Картер. – Л.: Гидрометеиздат, 1987. – 300 с.
10. Достанова, Р. Х. Фенольный комплекс растений при засолении среды: дис. д-ра биол. наук в форме научного доклада: 03.00.12 / Р. Х. Достанова; НГУ. – Новосибирск, 1994, – 42 с.

КУЛЬТУРЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ ЦИТРУСОВЫХ

Лапоногова В.А., Шибанова Н.Л.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: тетрациклин, стерильная культура, жизнеспособность; *Citrus limon* (L.) Osbeck, *Citrus medica* L.

Представлены результаты исследований влияния антибиотика тетрациклина на выход стерильной и жизнеспособной культур двух видов рода *Citrus* L.: *Citrus limon* (L.) Osbeck и *Citrus medica* L. Установлено, что статистически значимых различий по выходу стерильной культуры эксплантов *C. limon* в зависимости от режима стерилизации и при добавлении в питательную среду Мурасиге и Скуга тетрациклина не выявлено ($p=0,32$, $p<0,05$). Добавление тетрациклина в питательную среду при микроклональном размножении цитрона повысило выход стерильных эксплантов на 35% ($p=0,00$, $p<0,05$), но при этом снижало выход жизнеспособных эксплантов на 34,17% ($p=0,00$, $p<0,05$).

Существующие трудности при выращивании цитрусовых культур приводят к применению современных биотехнологических методов, одним из которых является метод микроклонального размножения, позволяющий работать вне зависимости от сезона, получать генетически однородное потомство с высоким коэффициентом размножения [1,4]. Одной из особенностей цитрусовых, усложняющей клональное микроразмножение, является высокий процент контаминации, что приводит к нестерильности условий и распространению инфекций. Поэтому для увеличения выхода стерильной культуры рекомендуется добавлять в среду тетрациклин в концентрации 400 мг/л [3].

Цель данной работы – изучить влияние антибиотика тетрациклина на выход стерильной культуры и жизнеспособность эксплантов двух видов рода *Citrus* L.: *Citrus limon* (L.) Osbeck и *Citrus medica* L. Исследования проводились в 2019-2020 гг. в лаборатории микроклонального размножения кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета. В качестве первичных эксплантов для клонального микроразмножения были использованы пазушные вегетативные почки с частью стебля длиной 1,5-2,5 см. Всего было высажено 153 экспланта лимона сорта Павловский и 88 эксплантов цитрона.

Стерилизацию проводили в три общепринятых этапа [2]. Режимы стерилизации представлены в табл. 1. Для лимона были использованы все режимы стерилизации, для цитрона – только третий режим. На этапе введения в культуру *in vitro* экспланты высаживались на питательную среду с минеральной основой по Т. Murashige и F. Skoog [6], 2,5% сахарозы и 0,7% агар-агара. В среду добавляли ауксин нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 0,5 мг/л, цитокинин 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрации 1,0 мг/л и витамины: тиамин, пиридоксин и никотиновую кислоту в концентрации по 0,5 мг/л каждый. Часть эксплантов высаживалась на среду с добавлением тетрациклина в концентрации 400 мг/л. При этом использовался первый режим стерилизации.

На этапе собственно микроразмножения использовалась среда с минеральной основой по J. Driver и A. Kuniyuki [5] с фитогормонами 6-БАП 2,0 мг/л и гибберелловой кислотой (ГК) 2,0 мг/л. На этапе укоренения микропобеги помещали на среду ½ MS с добавлением ауксинов – НУК 2,0 мг/л и индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) 1,0 мг/л.

Режимы стерилизации эксплантов цитрусовых

Режимы стерилизации Этапы стерилизации	I	II	III
Престерилизация	Нейтральный детергент (порошок марки «Пемос») 25 мин, проточная вода (промывка) 15 мин		
Стерилизация	95% этанол 5 сек, 10% раствор гипохлорита натрия «Белизна» 20 мин	0,2% раствор тетрациклина 10 мин, 10 % раствор гипохлорита натрия «Доместос» 15 мин, 95% этанол 5 сек	0,2 % раствор тетрациклина 10 мин, 95 % этанол 5 сек, 10% раствор гипохлорита натрия «Белизна» 15 мин
Пост- стерилизация	Промывка стерилизованной дистиллированной водой, трехкратно по 5 мин		

Стерилизация питательной среды в пробирках проводилась в автоклаве Sanyo MLS-3780 при температуре 120°C, давлении 1 атм. в течение 15 мин. Все этапы микроразмножения проводились в стерильных условиях в ламинар-боксе. Растения выращивались в климатической камере «BINDER KBF 720» в условиях искусственного освещения (2790 люкс), период 14/10, при температуре + 20±2 °C. Через три месяца после посадки на питательную среду экспланты были перенесены в условия естественного освещения и содержались при температуре + 15±2 °C. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали стандартный пакет анализа программы Microsoft Office Excel. Различия по критерию Фишера считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Микроклональное размножение лимона сорта Павловский и цитрона проводилось в четыре этапа, выделение которых является общепринятым [2]. На первом этапе важно получить хорошо растущую стерильную культуру.

Наиболее высокий процент выхода стерильных эксплантов лимона получен при использовании в качестве основного стерилизующего агента 10%-го раствора гипохлорита натрия «Белизна» в течение 20 мин. Он составил 85,0%. Наименее эффективным вариантом оказалось использование 0,2%-го раствора тетрациклина в течение 10 мин и 10%-го раствора «Доместос» в течение 15 мин. В этом случае выход стерильных эксплантов составил менее 64%. Статистически значимых различий по выходу стерильной культуры эксплантов *C. limon* в зависимости от режима стерилизации не выявлено ($p=0,06$; $p < 0,05$; $p=0,81$; $p < 0,05$; $p=0,10$; $p < 0,05$).

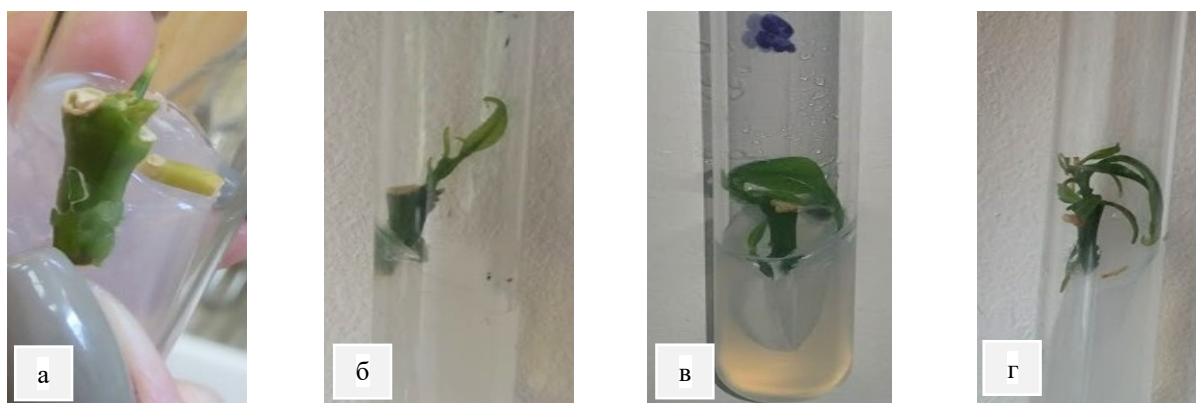
При использовании I режима стерилизации эксплантов лимона и добавлении в среду антибиотика тетрациклина в концентрации 400 мг/л выход стерильной культуры составил 87,8%, что всего на 2,8% выше, чем при использовании того же режима стерилизации без добавления антибиотика в среду; разница не достоверная ($p=0,76$, $p < 0,05$).

Также для стерилизации эксплантов использовался 10%-ый раствор гипохлорита натрия «Белизна» с экспозицией 15 мин в сочетании с 0,2 %-ым раствором тетрациклина в течение 10 мин. При таком режиме стерилизации удалось получить 66,7% стерильных эксплантов лимона и 42,5% – цитрона. При одновременном добавлении в среду антибиотика тетрациклина в концентрации 400 мг/л выход стерильной культуры цитрона увеличивался и

составил 77,5%. Таким образом, добавление тетрациклина в питательную среду повысило выход стерильных эксплантов на 35%, разница достоверная ($p=0,00$; $p < 0,05$).

На первом этапе культивирования исследуемых видов была использована питательная среда Мурасиге и Скуга (MS), в которую добавлялись регуляторы роста – 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК. Через три месяца на такой среде число адаптированных эксплантов с развивающимися микропобегами составило для *C. limon* – 52,5%, для *C. medica* – 66,7%. Добавление в среду тетрациклина в концентрации 400 мг/л снижало выход жизнеспособных эксплантов на 11,04% и 34,17% соответственно. Достоверные различия выявлены только для цитрона ($p=0,00$; $p < 0,05$).

Начало роста микропобегов на варианте среды без антибиотика наблюдалось через 1 неделю после посадки, а на среде с антибиотиком только через 2 недели. Появление первого листа отмечалось через 3-4 недели на первом варианте среды и через 5-6 недели – на втором. Развитие эксплантов лимона на питательной среде MS представлено на рисунке.



Развитие эксплантов *C. limon* L. на питательной среде Мурасиге и Скуга:

а – через 1 неделю после посадки; б – через 3 недели после посадки;

в – через 6 недель после посадки; г – через 7 недель после посадки

Остановка роста эксплантов происходила через 7-8 недель после посадки вне зависимости от варианта среды. Для возобновления роста цитрусовые пересаживались на питательную среду Драйвера и Каниуки с добавлением 2,0 мг/л БАП и 2,0 мг/л ГК. Через 7-8 дней после пересадки наблюдалось возобновление роста, через 13-14 дней – появление новых листьев, через 3-4 недели культивирования начиналось образование микропобегов. Для укоренения микропобегов среда $\frac{1}{2}$ MS с добавлением 1,0 мг/л НУКи 1,0 мг/л ИУК оказалась неэффективной. Процент укоренения составил 3,4.

Таким образом, при добавлении антибиотика тетрациклина в питательную среду Мурасиге и Скуга в концентрации 400 мг/л для увеличения выхода стерильной культуры лимона достоверных различий не выявлено ($p=0,76$, $p < 0,05$). Добавление тетрациклина в питательную среду при микроразмножении цитрона повысило выход стерильных эксплантов на 35%, разница оказалась достоверной ($p=0,00$, $p < 0,05$). Однако, добавление в среду тетрациклина снижало выход жизнеспособных лимонов и цитронов на 11,04% и 34,17% соответственно. Достоверные различия выявлены только для цитрона ($p=0,00$, $p < 0,05$).

Список цитируемой литературы

1. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии: учебное пособие. Москва: КолосС, 2004. – 295 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Монография. М.: ФБК-Пресс, 1999. – 159 с.

3. Самарина Л.С. Оптимизация приёмов микроразмножения и сохранения лимона *in vitro* // автореф. дис. канд. биол. наук. М., 2013. – 38 с.
4. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: учеб. пособие. Саратов. Изд-во СГУ, 2002. – 45 с.
5. Driver J.A., Kuniyuki A.H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock // Hort. Sci. – 1984. – Vol. 19. – P. 507-509.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15(3). – P. 490.

ДЕСТРУКЦИЯ ЛИНДАНА МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПЕСТИЦИДОМ ПОЧВ

Лобанов А.Н.¹, Назаров А. В.^{1,2}, Назарова Э. А.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: бактерии, γ -гексахлорциклогексан, деструкция, линдан

Линдан (γ -гексахлорциклогексан) – инсектицид широкого спектра действия, который использовался с 1949 года, из-за его токсичности, канцерогенности, терратогенности и способности накапливаться в окружающей среде на данный момент производство и сельскохозяйственное использование линдана запрещено в 182 странах [1]. Линдан применялся, главным образом, в сельском хозяйстве для защиты растений от насекомых вредителей, а также для обработки территорий от энцефалитных клещей, что привело к долговременному загрязнению почв [2]. Поэтому необходимы исследования биоразнообразия бактерий-деструкторов в загрязненных линданом почвах и их способности к разрушению данного пестицида для разработки биотехнологий очистки окружающей среды.

Целью настоящей работы являлось выделение бактерий-деструкторов линдана и оценка их способности к разложению данного инсектицида.

Из длительно загрязненной гексахлорциклогексаном почвы, отобранной с территории бывшего предприятия по производству пестицидов ОАО «СВЗХ», г. Чапаевск, Самарской области, методом накопительного культивирования на минеральной среде с линданом была получена ассоциация микроорганизмов. Микроорганизмы культивировали на минеральной среде К1, состав, г/л: $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 4.17; $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5; $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ – 0.4; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.15; $MnSO_4 \times 5 H_2O$ – 0,032; $FeSO_4$ – 0,018; $Ca(NO_3)_2 \times 4 H_2O$ – 0.01; pH 7.3, с добавлением линдана 0,1 г/л. В дальнейшем из накопительной культуры были получены чистые культуры бактерий на агаризованной среде LB [3], а также бактериальная ассоциация на среде К1 с добавлением в качестве субстрата бензоата натрия в количестве 1 г/л. Идентификация выделенных бактерий проведена на основе анализа гена 16S рРНК. ДНК из чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом [3]. Амплификацию гена 16S рРНК осуществляли на приборе приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler («Bio-Rad Laboratories», США) при использовании бактериальных праймеров 27F и 1492R [4]. Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК проводили с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (“Applied Biosystems”, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (“Applied Biosystems”, США) согласно рекомендациям производителя.

Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ Sequence Scanner v 2.0 и MEGA 6.0 (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных ezTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Для оценки способности выделенных штаммов, а также их ассоциаций разлагать линдан бактерии культивировали на среде K1 с 0,1 г/л линдана. Количество внесенных клеток бактерий в среду составляло 10^8 кл/мл. Для эксперимента использовали чистые культуры выделенных бактерий, бактериальную ассоциацию, полученную из накопительной культуры, а также бактериальную ассоциацию, которая была сформирована смешиванием в равном количестве клеток из чистых культур, всех выделенных бактерий. Через 3 и 6 месяцев производили измерение линдана, 1,3,4,5,6-пентахлорциклогексена, который является первым метаболитом в цепи деструкции бактериями линдана и фенолов, являющиеся также метаболитами бактериального разложения.

Определение остаточного содержания в культуральной среде линдана и 1,3,4,5,6-пентахлорциклогексена, который является метаболитом деструкции линдана бактериями, проводили в хлороформенных экстрактах на газовом хроматографе Agilent 7890B (Agilent, США) с трехквadrupольным масс-спектрометром Agilent 7010B (Agilent, США). Определение фенолов в культуральной жидкости проводили фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина [5].

Из полученной ассоциации были выделены бактерии, имеющие наибольшее сходство по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК с видами: *Achromobacter marplatensis* (сходство составило 99.26%), *Brevundimonas diminuta* (99.86%), *Mesorhizobium wenxiniae* (93.10%), *Ochrobactrum anthropi* (100.00%), *Ochrobactrum tritici* (99.37%), *Pseudomonas sichuanensis* (97,98%) и *Rhizobium pusense* (99.86%).

При культивировании в течение 6 месяцев всех бактериальных штаммов и ассоциаций выявлено снижение концентрации линдана на 9-17 мг/л. Наибольшая деструкция линдана была обнаружена в культуре бактерий *Ochrobactrum* sp. Во всех вариантах опыта в среде с бактериями был выявлен 1,3,4,5,6-пентахлорциклогексен, что указывает на бактериальное разложение линдана. Концентрация 1,3,4,5,6-пентахлорциклогексена во всех бактериальных культурах составляла через 3 месяца – 7-10 мг/л, через 6 месяцев – 3-4 мг/л. Через 3 месяца культивирования в среде во всех вариантах опыта выявлены фенолы в концентрации 0,3-0.6 мг/л, через 6 месяцев фенолы в культуральных средах не обнаружены за исключением бактериальной ассоциации № 2, в которой содержание фенолов составило 0,8 мг/л.

Таким образом, из почвы, отобранной с территории бывшего предприятия по производству пестицидов ОАО «СВЗХ», г. Чапаевск, Самарской области были выделены бактерии, относящиеся к родам *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas* и *Rhizobium*. Установлено, что все выделенные бактерии способны к деструкции линдана, что может быть использовано для создания биопрепаратов для очистки окружающей среды от данного пестицида.

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

Список цитируемой литературы

1. Амирова З. К., Сперанская О. А., Галимов Ш. Н. Новые стойкие органические супертоксианты и их влияние на здоровье человека. – М., 2016. 170 с.
2. Мониторинг пестицидов в объектах природной среды Российской Федерации в 2013. Обнинск: ФГБУ «ВНИИГМИ-МЦД», 2014. 72 с.
3. Ausubel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Short protocols in molecular biology. – New York: John Wiley and Sons, 1995. 450 p.
4. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematics / Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. – New York: John Wiley and Sons, 1991. P. 115–175.
5. Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. 448 с.

ВЛИЯНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА НА ЭКОСИСТЕМУ ПЛАНЕТЫ

Лопаева Н.Л.

Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия

Ключевые слова: мировой океан, воздух, леса, пластик, земля

Природа является напарником человека. Но не всегда отношения человечества и природы взаимовыгодны – чаще всего человек берет все, не отдавая ничего взамен. Люди являются немаловажным природным звеном, поэтому их деятельность, заметно сказывается на различных экосистемах.

Если ранее потеря сельскохозяйственных земель компенсировали за счет вырубки лесов, что в свою очередь способствовало обмелению рек и деградации почв, то теперь уже практически нечего вырубать. По подсчетам ученых при сохранении современных темпов моровой лес будет уничтожен всего за век. Каждый год исчезает 13 миллионов гектаров леса. Это равняется площади Греции. С 1980 по 2020 год 80 % сельскохозяйственных угодий появились на месте вырубленных тропических лесов площадью 1 миллион 300 тысяч квадратных километров. Самые производительные поставщики кислорода тропические леса Африки уничтожены на 70 %, Амазонии на 60 %, Южной Азии на 88 %. 50 лет тому назад тропические леса покрывали 14 % суши, в настоящий момент лишь около 6 %, к середине 1-го века тропические леса полностью исчезнут. Третий по величине остров планеты Борнео, территория которого больше от общей площади Германии и Польши еще двадцать лет назад был практически полностью покрыт густыми джунглями, они будут окончательно вырублены через 10 лет. Похожая ситуация сложилась и на Мадагаскаре, который является домом для 5 % видов живых организмов. На острове потеряно 90 % лесов, это стало причиной уменьшения запасов воды и сильной эрозии почв [3].

Не лучше ситуация и с мировым океаном. Хищнический вылов рыбы уже через 40 лет приведёт к опустошению его запасов. Искерпано 75 % территорий рыбных промыслов. С 1950 года вылов рыбы вырос в 5 раз, с 18 до 100 миллионов тонн. Причем через низкую эффективность треть ежегодного вылова 32 миллиона тонн выбрасывается на ветер. В таких условиях промышленная рыба не успевала возобновить свою численность. На 90 % уменьшился средний размер вылавливаемых рыб. Популяция голубого тунца, одного из самых популярных промышленных видов, с 1980 года уменьшилось на 70 %, уже в ближайшие годы он может исчезнуть. Рыба является основным рационом для каждого 5-го на планете, большими потребителями морепродуктов являются страны восточной Азии. Главное место принадлежит Китаю на долю которого приходится 1/3 всего мирового вылова. Однако уже скоро этим людям придётся обходиться без рыбы [1,2].

У нас заканчивается все: минеральные ресурсы и топливо, земля для выращивания еды и пригодная для питья вода, исчезает лес и рыба. И это всё притом, что растут наши расходы и наша численность. Однако не только продовольственно-ресурсный кризис угрожает человечеству и дело здесь не только в глобальном потеплении.

Наш активный прогресс веков разжег глобальную печь, которая не только нагревает планету, пожирая ежегодно 10 миллиардов тонн топлива, но и задымляет все вокруг, выбрасывая в атмосферу 22 миллиарда тонн углекислого газа, 150 миллионов тонн окиси серы, около 300 миллионов тонн окиси углерода, 50 миллионов тонн окиси азота, то 200 до 700 миллионов тонн пыли и дыма. 80 % населения планеты дышит загрязненным воздухом. В каждом втором городе превышен допустимый уровень загрязнения. Сегодня в городах загрязнение воздуха в 15 раз выше, чем в сельской местности и в 150 раз выше, чем над океаном.

Под воздействием разнообразных химических соединений антропогенного происхождения, ведущее место которое принадлежит фреону, разрушается озоновый слой планеты, который не только сохраняет её от потери воздуха, но и защищает от губительного ультрафиолетового излучения, которое способно уничтожить все живое.

Изменение химического состава атмосферы вызывает интенсификацию кислотных дождей, они отравляют окружающую среду, загрязняют почву и водоемы. До 2050 года кислотность вод морского океана вырастет на 150 %, это вызовет необратимые изменения морских экосистем. Ежегодно в мировой океан попадает свыше 30 тысяч разнообразных химических соединений количеством до 1 миллиарда 200 миллионов тонн. Из них 10 миллионов составляет нефть. Она вытекает из поврежденных скважин и танкеров. Около 20 % поверхности морских вод покрыто нефтяной плёнкой разной толщины. Ежегодно в воды океана попадает 260 миллионов тонн пластмассовых изделий. Уже существуют целые пластиковые континенты, наибольший из них сосредоточен в Тихом океане и занимает до 8 % его поверхности. Каждый день в водоемы планеты попадает 2 миллиона тонн человеческих отходов, не очищенные сточные воды оказывают сильное влияние на здоровье 2 миллиардов 600 миллионов человек. Большинство методов очистки воды, которое широко применяется в мире, убивает не только возбудителей болезней, но и наши организмы. Загрязнение поверхности водоемов приблизительно на 90 % обусловлено сельскохозяйственной деятельностью. Годовой сток большинства рек несет, в океан значительное количество удобрений, а также других агрохимикатов [5].

Современное сельское хозяйство является настоящим экологическим безумием, ведь оно приводит к истощению водоносных пластов и рек, истощению почв и их эрозиям. Нитраты и пестициды лишь временно улучшают плодородие, впоследствии приводя к умиранию почвы, загрязнению водоемов и даже целого океана. Эта ситуация ярче себя проявила в Китае, который смог благодаря агрохимикатам, значительно повысить урожайность своих земель, но этим самым, способствуя их ускоренной деградации. Уже через 35 лет Китай может потерять большинство сельскохозяйственных угодий. Продукция, выращенная современными промышленными методами, уже не содержит в достаточной мере тех питательных веществ, которые необходимы нашему организму. Зато она отравляет нас разными химикатами. За последние 100 лет содержание витаминов и микроэлементов в овощах и фруктах уменьшилось на 70 %. Причины этому есть загрязнение, удобрение, пестициды, истощение почв и ГМО. Из генно модифицированных организмов изготавливается почти половина продовольствия. Похожая ситуация сложилась и со всеми другими продуктами питания, которые производятся не для того, чтобы их ели на здоровье, а для того чтобы больше и выгоднее продать, не думая о последствиях. Количество нереализованных продуктов питания, которые идут на свалки США, составляет около 40%, в Великобритании 31 %. В целом по ЕС в год выбрасывается 90 миллионов тонн не проданной еды и это притом, что голодных в мире уже больше миллиарда. Учитывая, что на выращивание и транспортировку этой еды тратится огромное количество горючего и ресурсов [4,6].

Современная экономика является не экологичной, а, следовательно, не экономической, это псевдоэкономика. Мировом руководят деньги, за них покупается и продается всё. Это очень выгодно тем, кто контролирует деньги – транснациональным корпорациям. Именно они, а не политики, которые являются лишь для них прислугой, руководя народами, и направляет развитие человечества в бездну. Современный капитализм с его конкуренцией, монополиями, рекламой и сверх затратностью направлены лишь на кратко срочную прибыль, на то, чтобы урвать, а не на развитие. Он превратил мировое хозяйство в огромное казино, где пока еще идет азартная игра. Однако скоро мы все будем в проигрыше и те, кто в настоящий момент наслаждается роскошью и властью, завтра тоже станут банкротами.

Список цитируемой литературы

1. Володавец В.В., Микробное загрязнение сточных вод крупного животноводческого комплекса на разных этапах биологической очистки. // Гигиена и санитария. – 2009. – № 2. С.68-69.
2. Кузнецов, А. Ф. Современные производственные технологии содержания сельскохозяйственных животных: учебное пособие / А. Ф. Кузнецов, Н. А. Михайлов, П. С. Карцев. – Санкт-Петербург: Лань, 2021. – 456 с. – ISBN 978-5-8114-1312-6. – Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/168527> (дата обращения: 04.04.2021). – Режим доступа: для авториз. пользователей.
3. Литвинова Л.И., Чудова И.Г.// Проблемы больших городов. Обзорная информация МГЦНТИ – М., 1990. – Вып.22.
4. Лопаева Н.Л, Тяпкова Е.Ю. Гигиеническое значение воды в животноводстве в книге: Современная аграрная наука: проблемы и пути решения. Сборник тезисов круглого стола в формате online. 2020. С. 180-181. Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44230831>.
5. Лопаева Н.Л., Неверова О.П., Чепуштанова О.В., Шаравьев П.В. Экологические аспекты урбанизированных территорий статья в сборнике трудов конференции. "От инерции к развитию: научно-инновационное обеспечение АПК". -2020. С. 111-113
6. Можаяев Е.А., Гигиеническая оценка методов очистки сточных вод свиноводческого комплекса на сельскохозяйственных полях орошения. // Гигиена и санитария. – 2002. – № 6. С.13-16.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Максимов А.Ю.^{1,2}, Максимова Ю.Г.^{1,2}, Щетко В.А.³

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

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

³Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Ключевые слова: бактериальная биодеструкция, биоудобрение, кородревесные отходы, целлюлазы, гидролитическая активность

Материалы, продукты и отходы биогенного составляют бо'льшую часть органического вещества Земли. Растительные продукты являются основным классом возобновляемого сырья, рациональное использование которого важно для гармоничного существования природы и человечества. Это огромная масса ценных продуктов и отходов сельского хозяйства, деревообработки, целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности. Однако чаще всего отходы этого ценнейшего биогенного сырья не перерабатывается, а складывается и являются причиной серьёзных экологических проблем, таких как пожары, ухудшение состояния почв и водных систем, цветение водоёмов и т.д. К таким опасным вредоносным объектам относятся места складирования опила и щепы лесопромышленного комплекса и деревоперерабатывающих предприятий, короотвалы целлюлозно-бумажных комбинатов, множественные отходы ботвы, соломы, плодоовощной продукции, навоза и куриного помёта в сельском хозяйстве, отходы пищевой промышленности и др. [1, 2]. Для решения экологических проблем, связанных с биогенными отходами, обычно предлагаются технологические и химические способы ликвидации. Данные способы наиболее эффективны для свежих древесных материалов, соломы, но не для увлажнённых отходов [2-5].

В практике экологических ведомств РФ ликвидация и рациональное использование ценных ресурсов – биогенных отходов часто подменяются захоронением в "саркофагах", герметизацией, бетонированием, сжиганием без извлечения энергии, таким образом из одной экологической проблемы под видом её решения создаётся несколько более серьёзных.

Наиболее рациональными подходами глубокой переработки биогенных отходов и органического сырья являются разные варианты биотехнологических процессов с применением биокаталитических и ферментационных процессов, приводящие к получению новых ценных продуктов, таких как строительные и конструкционные материалы, грунты, гуматы, корма и кормовые добавки для животноводства, органические удобрения, мелиоранты, субстраты для мульчирования, биогаз, жидкое топливо и др. Также ферментативные способы востребованы для переработки сырья и продуктов в разных сферах пищевой промышленности. В качестве организмов, которые активно осуществляют такие ферментационные процессы на практике могут быть использованы различные бактериальные продуценты, макро- и микромицеты [3, 4, 6].

Большой потенциал для рационального использования биогенных отходов имеют бактерии и микромицеты – продуценты гидролитических ферментов (целлюлаз, гемицеллюлаз, амилаз, липаз, протеаз, пектиназ и др.), их искусственные сообщества. Алкалофильные бактерии – продуценты ферментов, растущие при высоких значениях pH, интересны в плане изучения механизмов адаптации бактерий к экстремальным значениям pH, а также перспективны для биотехнологического применения, поскольку щелочные среды характерны для многих искусственных сред и техногенных процессов, в частности, для моющих сред, продуктов и отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Цель работы – выделение и исследование микроорганизмов-продуцентов гидролитических ферментов, в том числе из экстремально-защелоченной среды, выявление лимитирующих средовых факторов биодеструкции и оценка биотехнологического потенциала биодеструкторов для переработки биогенного целлюлозосодержащего сырья.

Выделение микроорганизмов, гидролизующих растительные биополимеры, проводили из микробиома кородревесных отходов (КДО), а также из естественных дерново-подзолистых почв и техногенных щелочных биотопов. Выделение и учет численности бактерий, обладающих способностью к гидролизу используемых субстратов, проводили методом предельных разведений и прямого посева. Для культивирования бактерий использовали среды N и Пфеннига с добавлением соответствующих искомой активности субстратов [2,3,7]. В качестве источника углерода использовали специфические субстраты – целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, казеин, крахмал, ТВИН-20. Целлюлозолитическую активность анализировали в тесте с карбоксиметилцеллюлозой и Конго красным, а также с помощью анализа продуктов гидролиза целлюлозы. Продукты биodeградации субстратов определяли методами ВЭЖХ и ГХ, а также спектрофотометрией продуктов гидролиза хромогенных субстратов [4, 7]. Изменение оптической плотности проводили на спектрофотометре Ultraspec3000, «GE Healthcare» (США) и планшетном спектрофотометре Infinite M1000 «Tecan», (Швейцария).

Видовую идентификацию изолятов проводили методом секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. Гомологию полученных нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК анализировали с использованием сервиса BLAST и программы Chromas Lite 2.1.

Для получения искусственных сообществ, способных к активной переработке растительных отходов и материалов, использовали выделенные биодеструкторы целлюлозы, а также ранее селекционированные культуры, сбраживающие углеводные и белковых компоненты и утилизирующие липидные вещества и метаболиты растительных клеток.

В результате проведенного отбора из природных и техногенно-измененных сред были изолированы актинобактерии родов *Cellulomonas* и *Streptomyces*, активно гидролизующие целлюлозу, обладающие активностью выше, чем у многих известных культур [8]. В частности, изоляты, обладающие высокой целлюлолитической активностью, идентифицированы путем секвенирования генов 16S рРНК как *Cellulomonas flavigena* C11, *Streptomyces viridobrunneus*

S3и др. Из образцов материала содового шламохранилища изолированы чистые культуры алкалофильных и алкалотолерантных микроорганизмов, обладающих гидролитической активностью в отношении полисахаридов и липидов. Проведен скрининг на амилалитическую и липолитическую активность изолятов, выделенных на среде с рН 11 и рН 8. Бактерии, обладающие активностью липазы, выделены из всех образцов. Максимальная их численность установлена в образцах техногенных поверхностных образований шламохранилища (5.7×10^9 КОЕ/г), что связано с использованием поверхностно-активных веществ в цикле производства соды и их попаданием в промывные воды. Высокая липолитическая активность отмечена у культур бактерий *Pseudomonas peli*, *Pseudoxanthomonas mexicana* и *Pseudoxanthomonas putridarbori*. Максимальная активность внеклеточной амилазы обнаружена у изолята 16-ДБ, идентифицированного как *Microbacterium kitamiense*. Проведены эксперименты по биодеструкции растительного сырья консорциумами бактериальных культур. Для этого предварительно прогретые образцы инокулированы культурами бактерий *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Lactobacillus*.

Активность процессов биодеструкции определяли по убыли массы сухого остатка (%), содержанию водозэкстрагируемых фенольных соединений и ацетат-иона, высвобождаемых при биодеструкции, мг/л. Установлено, что при инокуляции 10^9 бактериальных клеток на литр среды, оптимизации элементного состава среды и рН, при использовании искусственного сообщества *Cellulomonas*+*Streptomyces* потеря массы по сухому весу в течение 90 сут составляет 8–27 %. При увеличении начальной концентрации КОЕ скорость процесса кратно возрастает. Установлено, что ферментированная таким образом масса КДО при её стабилизации аммиачной водой и фосфатами является эффективным биоудобрением.

Показано, что консорциумы, состоящие из целлюлозолитических бактерий и бактерий, активно осуществляющих брожение, при длительной экспозиции (30, 45, 60 дней) образуют большое количество белоксодержащей микробной массы (до 16 % по сухому весу). Процесс может быть ускорен при увеличении температуры инкубации за счет её технологической регуляции, либо естественного разогрева в толще ферментируемой массы при масштабной переработке растительных отходов при компостировании. Таким образом, комплексные биопрепараты безопасных для человека и животных микроорганизмов-продуцентов гидролитических ферментов могут быть использованы для производства кормового белка.

Таким образом, рациональным способом переработки растительного сырья является ферментация высокоактивными культурами и адаптированными искусственными сообществами в оптимизированных условиях по содержанию биогенных элементов и микроэлементов с использованием с получением в результате новых органических материалов с добавочной стоимостью. Селекционированные в результате проведенной работы микроорганизмы-продуценты ферментов и биодеструкторы перспективны для переработки различных биогенных материалов и отходов. Показано, что биологические технологии с их применением могут быть использованы для глубокой модификации или утилизации сырья и отходов сельскохозяйственных и пищевых производств, целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности. На основе полученных результатов предложена новая стратегия ферментации целлюлозосодержащих отходов, которая ранее не рассматривалась в применении к переработке биогенных отходов.

Работа выполнена в рамках проекта международных исследовательских групп (соглашение № С-26/507 от 09.03.2021), финансируемого Министерством образования и науки Пермского края.

Список цитируемой литературы

1. Monte, M.C. Waste management from pulp and paper production in the European Union. / M.C. Monte [et al.] // Waste Management and Research. – 2009. – V.29. – P. 293 –308.
2. Максимов, А.Ю. Исследование свойств и микробиологического состава кородревесных отходов короотвала г. Краснокамск / А.Ю. Максимов [и др.] // Вестник Пермского

- национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. – 2018. – № 4. – С. 98–112.
3. Максимов, А.Ю. Получение биоудобрения на основе отходов целлюлозно-бумажной промышленности / А.Ю. Максимов [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Сб. научн. трудов. – Минск, 2019. – С. 277–287.
 4. Федорец, Н.Г. Органические удобрения из отходов деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности / Н.Г. Федорец, О.Н. Бахмет // Экология и промышленность России. – 2008. – №4. – С. 13–15.
 5. Максимов А.Ю. Экстракция гумата калия из материала, полученного путём микробиологической переработки кородревесных отходов / А.Ю. Максимов [и др.] // Вестник Пермского университета. Серия: Химия. – 2020. – Т. 10, № 4. – С. 356–369.
 6. Заявка на патент РФ на изобретение №2013143384 от 26.09.2013 г «Способ биотехнологической переработки твердых отходов целлюлозно-бумажной промышленности для получения биогумуса, включающий стадию обработки грибами и стадию вермипереработки»
 7. Шилова, А.В. Выделение и идентификация алкалотолерантных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища / А.В. Шилова, А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 2. – С. 155–165.
 8. Bayer, E.A. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management / E.A. Bayer, R. Lamed, M.E. Himmel // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – № 18 (3). – С. 237–245.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ *PAENARTHROBACTER* SP. SA101

Малышева А.А.¹, Ястребова О.В.², Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: бактериальная деструкция, *Paenarthrobacter*, фталаты

Фталаты – производные *орто*-фталевой кислоты и сложные эфиры фталатов (дибутилфталат, ДБФ; диметилфталат, ДМФ; диэтилфталат, ДЭФ и др.) представляют собой синтетические соединения, используемые преимущественно в качестве добавок для улучшения механических свойств пластмасс, в частности гибкости, морозостойкости. Данные пластификаторы не связаны ковалентно с пластиковыми носителями и способны мигрировать в окружающую среду [1, 2].

Фталаты способны к биоаккумуляции в экосистемах, которая усиливается в пищевой цепи, и представляют угрозу здоровью человека [3]. После десятилетий глобального промышленного использования в качестве пластификаторов сложные эфиры фталатов в настоящее время признаны распространенными загрязнителями окружающей среды, причем самые высокие концентрации обнаружены вблизи предприятий по производству и переработке сложных эфиров фталатов [2, 4].

Одним из крупнейших производств нефтегазохимической промышленности Пермского края является ЗАО «Сибур-Химпром». На данном предприятии осуществлен запуск крупнейшего на территории России производства пластификатора – диоктилтерефталата (ДОТФ) – ключевого компонента в производстве кабельных пластиков и различных материалов строительной отрасли.

Производство в промышленных масштабах требует мониторинга веществ, используемых в технологическом цикле и продуктов их трансформации (в том числе, фталатов), в объектах окружающей среды. На предприятии введен в эксплуатацию блок биологической очистки сточных вод (БОС), позволяющий утилизировать некоторые токсичные соединения.

Разложение фталатов может осуществляться как с помощью химических, физических методов (гидролиз, фотолиз), так и биологическими методами – микробной деструкцией. Метаболические пути разложения сложных эфиров фталатов включают их разложение до *орто*-фталевой кислоты (*орто*-ФК), являющейся ключевым интермедиатом, с разложением последней через протокатеховую кислоту (рис. 1) [5, 6].

Цель настоящей работы – выделение и характеристика индивидуальных штаммов бактерий, способных к деструкции фталатов, из образцов промышленных стоков и активного ила БОС предприятия ЗАО «Сибур-Химпром» (Пермский край).



Рисунок 1 – Путь бактериальной деструкции дибутилфталата [5, 6]

Из образцов сточных вод и активного ила БОС предприятия «Сибур-Химпром» (Пермь) методом накопительного культивирования и прямого высева на богатые и минеральные среды с фталатами выделен ряд штаммов-деструкторов фталатов. Грамположительный штамм SA101, выделенный из сточных вод, был способен к росту на *орто*-ФК и *тере*-фталате (ТФК). На основании секвенирования и последующего биоинформационного анализа гена 16S рРНК штамм SA101 был идентифицирован как представитель рода *Paenarthrobacter* (семейство *Micrococcaceae*), близкородственный штамму *Paenarthrobacter ureafaciens* NC^T (уровень сходства по гену 16S рРНК составлял 99,29%). На дендрограмме данный штамм находится в одном кластере с типовым штаммом вида *P. ureafaciens* NC^T (рис. 2).

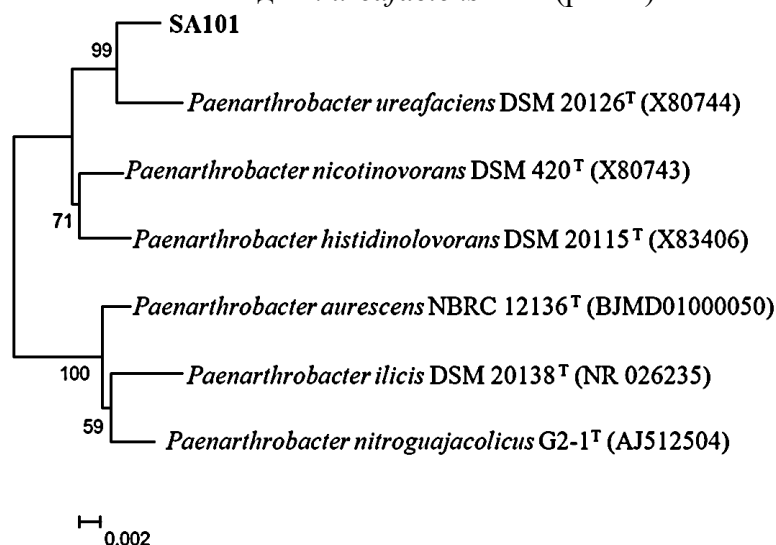


Рисунок 2 – Дендрограмма, отображающая филогенетическое положение штамм SA101 в системе рода *Paenarthrobacter* (сем. *Micrococcaceae*)

Установлено, что штамм SA101 обладает широкой субстратной специфичностью и способен к росту в минеральной среде на фталатах и моно(поли)ароматических углеводородов в качестве субстратов: ТФК, ДОТФ, *орто*-ФК, ДМФ, ДБФ, ДЭФ, бензойной, протокатеховой кислотах (ПКК), нафталине и фенантрене.

На основании способности штамма *Paenarthrobacter sp.* SA101 к росту на *орто*-фталате и протокатеховой кислоте можно предположить, что деструкция сложных фталатов – ДБФ, ДЭФ и ДМФ, осуществляется через образование *орто*-ФК и ПКК, как ключевых метаболитов (рис. 1), как показано для ряда штаммов сем. *Micrococcaceae* [6, 7]. При использовании праймеров к гену *phtA*, кодирующего большую субъединицу *орто*-фталат 3,4-диоксигеназы, с ДНК штамма *Paenarthrobacter sp.* SA101 получен ампликон, соответствующий по размеру фрагментам генов референтных нуклеотидных последовательностей (600 п.н.). Таким образом, из сточных вод предприятия «Сибур-Химпром» выделен активный штамм-деструктор фталатов и ароматических углеводородов, перспективный для дальнейших исследований с целью создания новых биотехнологий очистки почв и стоков, загрязненных широким спектром экотоксикантов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта №19-44-590011 р_а.

Список цитируемой литературы

1. Graham, P.R. Phthalate ester plasticizers—why and how they are used // *Environ. Health Perspect.* – 1973. – V. 3. – P. 3–12.
2. Przybylinka P.A., Wyszowski E. Environmental contamination with phthalates and its impact on living organisms // *Ecol. Chem. and Engineer.* – 2016. V. 23(2). – P. 347-356.
3. Liang D.-W., Zhang T., Fang H. Phthalates biodegradation in the environment // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – V. 80. – P. 183-198.
4. Staples, C.A., Parkerton T.F., Peterson D.R. A risk assessment of selected phthalate esters in North American and Western European surface waters // *Chemosphere* – 2000. – V. 40. – P. 885–891.
5. Eaton R.W. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter keyseri* 12B // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183. – №12. – P. 3689-3703.
6. Jin D.-C., Liang R.-X. Biodegradation of Di-n-Butyl Phthalate by *Rhodococcus sp.* JDC-11 and Molecular Detection of 3, 4-Phthalate Dioxygenase Gene // *Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 20. – № 10. – P. 1440-1445.
7. Yang T., Ren L., Jia Y., Fan S., Wang J., Wang J., Nahurira R., Wang, H., Yan Y. Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by *Rhodococcus ruber* YC-YT1 in contaminated water and soil // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2018. – V. 15. – P. 964.

КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

Минкевич И.Г.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ
Пушкинский центр биологических исследований РАН, Московская обл., Пушкино, Россия

Ключевые слова: метаболизм живых клеток, стехиометрия, обратимые и необратимые реакции, векторно-матричное представление, метаболические потоки

Работа посвящена разработке метода и осуществляющего этот метод пакета компьютерных программ для теоретического составления метаболических путей, превращающих заданные исходные вещества в заданные продукты [1,2].

Математическая основа компьютерных алгоритмов разработана с использованием стехиометрических свойств биохимических реакций, которые представлены в векторно-матричной форме. Для решения конкретных биохимических задач исследователем создаётся локальная (помещённая в данный компьютер) база данных об элементном составе метаболитов, о биохимических реакциях (включая их стехиометрические коэффициенты и сведения об обратимости или необратимости реакции). Источником таких сведений служат, прежде всего, открытые базы биохимических данных, имеющиеся в Интернете. Локальная база должна быть заведомо шире совокупности реакций, входящих в искомый метаболический путь [3,4]. Пакет компьютерных программ, разработанных нами, выбирает из локальной базы те реакции, которые обеспечивают конверсию заданных субстратов в заданные продукты. Так находится метаболический путь с полной картиной скоростей всех входящих в него реакций, а также скоростей поступления субстратов и образования продуктов, включая баланс носителей восстановленности (NADH, NADPH) и макроэнергических связей (АТФ, GTP и др.). Это, в свою очередь, позволяет получить теоретическую оценку наибольшего возможного выхода продукта (в том числе биомассы клеток) из заданного субстрата. Данный подход показал свою эффективность при изучении метаболизма бактерий, окисляющих нафталин, бактерий и дрожжей, растущих на метаноле и этаноле как источниках вещества и энергии. Детальное описание основ метода компьютерного конструирования метаболических путей приведено в статьях, ссылки на которые даны ниже [1-5].

Список цитируемой литературы

1. Minkevich I.G. Stoichiometric synthesis of metabolic pathways. // Computer Research and Modeling. – 2015. – V. 7. – No. 6. – P. 1241–1267.
2. Минкевич И.Г. Математические проблемы организации метаболических путей из биохимических реакций. // Математическая биология и биоинформатика. – 2016. – Т. 11. – No 2. – С. 406 – 425.
3. Minkevich I. G. The Effect of Cell Metabolism on Biomass Yield during the Growth on Various Substrates. // Computer Research and Modeling. – 2017. – Vol. 9. – No. 6. – P. 993–1014.
4. Minkevich I.G. Estimation of Maximal Values of Biomass Growth Yield Based on the Mass-Energy Balance of Cell Metabolism. Computer Research and Modeling. – 2019. – V. 11. – No. 4. – P. 723–750.
5. Минкевич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». Москва-Ижевск. 2005. 351 с.

МОНИТОРИНГ ШИГА-ТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* В ПОПУЛЯЦИИ ЗДОРОВЫХ ЖИВОТНЫХ

Михайловская В.С.¹, Артамонова О.А.², Кузнецова М.В.³

¹ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

² Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. Вагнера,
Пермь, Россия

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

Ключевые слова: шига-токсинпродуцирующие *E. coli* (STEC), генетические детерминанты вирулентности, здоровые животные.

Escherichia coli является постоянным обитателем кишечника животных и человека, однако среди эшерихий встречаются безусловные патогены – возбудители острых кишечных инфекций. Особенно опасны шига-токсинпродуцирующие *E. coli* (STEC), вызывающие массовые вспышки заболеваний сельскохозяйственных животных и человека [1]. Шига-подобные токсины *E. coli* разделяют на 2 группы: Stx1 и Stx2. Механизм их действия связан с нарушением синтеза белка в эукариотических клетках [2]. Сельскохозяйственные животные являются основным источником STEC, поэтому мониторинг распространения STEC в поголовьях, в том числе среди здоровых особей, является актуальным.

Цель исследования – выявление распространенности шига-токсинпродуцирующих штаммов *E. coli* в популяции здоровых животных.

Методы и материалы. В работе были использованы штаммы *E. coli* (n=73), выделенные на предприятиях промышленного животноводства и частных фермерских хозяйствах Пермского края из фекалий здоровых животных (от птиц – 16, свиней – 3, кроликов – 4, коров – 50 штаммов). Детектировали гены *stx1* и *stx2*, а также определяли некоторые детерминанты вирулентности – *fimH*, *papC*, *sfaDE*, *iha*, *iroN*. Режимы амплификации и праймеры использовали согласно рекомендациям авторов [3]. Амплификацию ДНК проводили с применением реагентов производства ООО «Синтол» (Россия) на термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США). Визуализацию полос осуществляли с помощью системы геле-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США).

Результаты. Ген *stx1* был детектирован только в одной культуре (1,4%), изолированной от теленка, *stx2* присутствовал в геноме пяти (6,9%) культур. Таким образом, было обнаружено шесть штаммов STEC (8,2%). Распространенность генов адгезинов составила: *fimH* – 86,3%, *papC* – 13,7%, *sfaDE* – 20,6%, *iha* – 0%, гена системы захвата и транспорта железа *iroN* – 17,8%. Адгезия к эпителиальным клеткам является важным признаком вирулентности, поскольку позволяет патогенам колонизировать организм хозяина, в этом случае токсины доставляются к органам более эффективно. Например, фимбрии 1 типа с помощью адгезина FimH связываются с рецепторами клеток мочевого пузыря [4]. Интересно, что *sfa* экспрессируется преимущественно штаммами, вызывающими сепсис и менингит [5]. Согласно нашим данным, адгезиновый профиль STEC является разнородным: пять из шести штаммов (83%) содержали FimH, два – SfaDE, один – PapC. В популяции здоровых животных присутствовали STEC с комбинацией генов адгезии. Найден штамм, продуцирующий Stx2 и содержащий 3 типа адгезинов: PapC, FimH и SfaDE, а также штамм, в котором присутствуют гены *stx2*, *fimH* и *sfaDE*. Это значит, что среди штаммов, полученных от здоровых сельскохозяйственных животных, встречаются шига-токсинпродуцирующие *E. coli* с высоким вирулентным потенциалом.

Таким образом, знание о распространенности STEC имеет большое значение для разработки профилактических мероприятий на предприятиях животноводческого направления и составления выводов о безопасности пищевых продуктов.

Работа выполнена при поддержке правительства Пермского края по гранту №С-26/541

Список цитируемой литературы

1. Mainga A.O., Cenci-Goga B.T., Malahlela M.N., Tshuma T., Kalake A. Occurrence and characterization of seven major Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes from healthy cattle on cow-calf operations in South Africa // Zoon. Pub. Health. – 2018. – V. 65(7). – p. 777-789.
2. Kavaliauskiene S., Berit D.L.A., Skotland T., Sandvig K. Protection against Shiga Toxins // Toxins.-2017. –V.9. – p. 2-25.
3. Chapman T.A., Wu X.Y., Barchia I., Bettelheim K.A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J.J. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – V. 72(7). – p. 4782-95.

4. Каюков И.Г. Некоторые вопросы этиопатогенеза, диагностики и тактики ведения пациентов при инфекциях мочевыделительных путей // Почки и здоровье. – 2011. – №15. – с. 71-80.
5. Dobrindt U., Blum-Oehler G., Hartsch T., Gottschalk G., Ron E.Z., Fünfstück R., Hacker J. S-Fimbria encoding determinant *sfa*_I is located on pathogenicity island III₅₃₆ of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536 // Infect. Immun. – 2001. – V.69 (7). – p. 4248-56.

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ УРБОСТРАТОЗЕМОВ ЖИЛЫХ РАЙОНОВ Г. ПЕРМИ МЕТОДОМ ФИТОТЕСТИРОВАНИЯ

Москвина Н.В., Фаткуллина А.З.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: городские почвы, урбостратоземы, экологическое состояние, фитотестирование.

В городской среде формирование почв идет различными путями. Морфологическое разнообразие почв и ТПО многоэтажной части города зависит от видов антропогенной деятельности, а также от возраста почвы, определяющего выраженность городского почвообразования [1]. Направленность почвообразовательных процессов в почвах и ТПО определяется ведущими антропогенными процессами, основными из которых являются: внесение торфа и компоста; запечатывание асфальтом; самозаращение естественной растительностью; переуплотнение; техногенное загрязнение [1,2,3].

Исходным субстратом для почвообразования в зоне многоэтажной застройки чаще всего являются почвогрунты, сформированные из природных почв разного гранулометрического состава. Образование урбостратоземов происходит путем зарастания почвогрунтов рудеральной растительностью. В жилых районах с современной застройкой такие почвы, как правило, имеют возраст 60-70 лет, что позволяет говорить о начальных стадиях городского почвообразования. Оценка экологического состояния почв в городской среде позволит выявить их способность к выполнению экологических функций и спрогнозировать устойчивость к антропогенным факторам.

Целью работы была оценка экологического состояния урбостратоземов жилых районов г. Перми методом фитотестирования.

В ходе исследования было проведено фитотестирование поверхностных слоев 16 урбостратоземов, отобранных в Индустриальном и Свердловском районах г. Перми. Урботрансформированные почвы были названы в соответствии с подходами, предложенными для почв и ТПО городских территорий в рамках классификации почв 2004 г. [3].

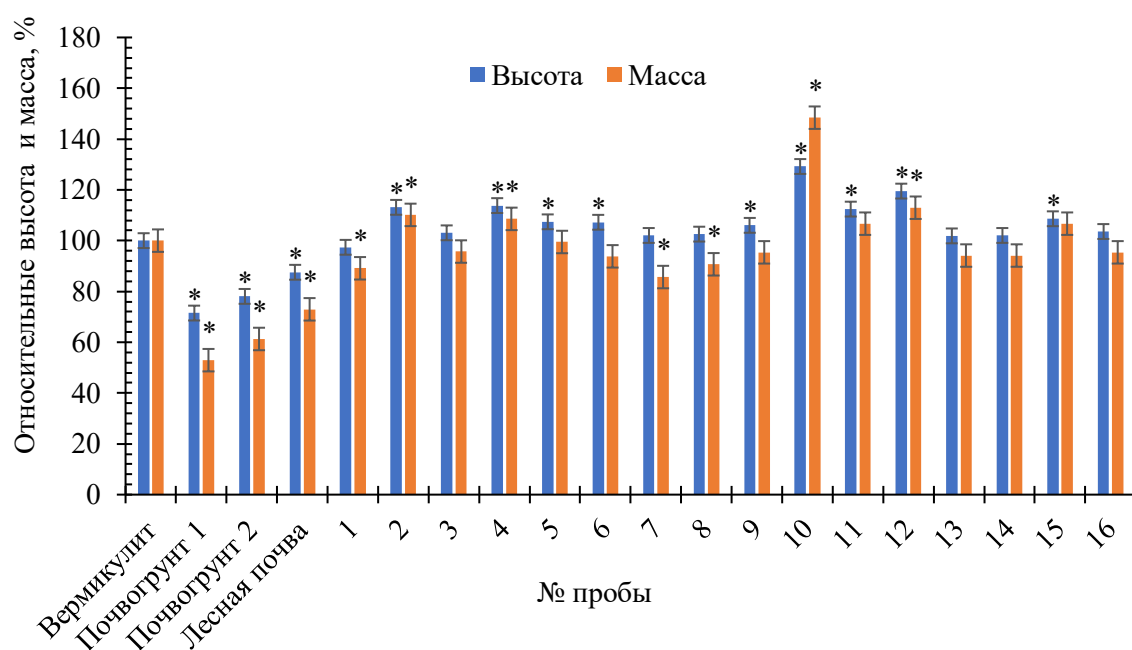
В качестве контроля были использованы вермикулит, однократно политый питательным раствором Кнопа [4], суглинистый почвогрунт (литострат, группа натурфабрикатов) с двух строительных площадок на территории Индустриального района, а также поверхностный серогумусовый горизонт АУ зональной лесной дерново-подзолистой почвы, отобранный в Парке Победы на территории лесного массива в Индустриальном районе г. Перми.

Кресс-салат выращивали на природных и городских почвах в течение 10 дней, измеряли высоту и массу одного растения в 30-кратной повторности.

Данные по высоте и массе растений обработали статистически в программе PAST. Сравнение выборок провели дисперсионным непараметрическим методом (критерий Краскала-Уоллиса); достоверными считали различия между медианами выборок с доверительной вероятностью 95% и выше ($P < 0,05$).

Согласно патенту О.З. Еремченко и Н.В. Митраковой [4], при снижении показателей развития кресс-салата на тестируемой почве на 10–30% по сравнению с вермикулитом состояние почвы или почвогрунта следует считать удовлетворительным; при снижении на 30–50% – неудовлетворительным; а при уровне снижения показателей более 50% считать экологически опасным.

Результаты исследований показали, что высота и масса растений на пробах из почвогрунта и серогумусового горизонта зональной почвы оказались достоверно ниже, чем на пробах из вермикулита. По высоте различия составили в среднем 25% и 13% для почвогрунта и серогумусового горизонта соответственно; по массе – 43 и 27% соответственно (рис.). Эти показатели позволяют утверждать, что в целом экологическое состояние почвогрунта и серогумусового горизонта можно оценить как удовлетворительное, согласно патенту Еремченко и Митраковой, однако почвогрунт и серогумусовый горизонт дерново-подзолистой почвы обладают более низкими показателями плодородия для тест-культуры, чем вермикулит как эталон плодородной почвы.



Высота и масса тест-культуры, выращенной на пробах поверхностных слоев урбостратоземов, % от тест-контроля (вермикулит); * – достоверные различия (по критерию Краскела-Уоллиса)

Высота и масса растений, выращенных на пробах из поверхностных слоев урбостратоземов, превышали высоту и массу растений, выращенных на пробах почвогрунтов в среднем на 43 и 75% соответственно, а также высоту и массу растений, выращенных на серогумусовом горизонте зональной дерново-подзолистой почвы на 24 и 39% соответственно. Отмечено также, что высота растений, выращенных на пробах из урбостратоземов, в половине случаев достоверно превышает высоту растений на вермикулите. Для массы такая закономерность прослежена примерно в 40% случаев.

Это свидетельствует об оптимальных условиях для развития растительности и достаточной обеспеченности элементами питания растений поверхностных горизонтов урбостратоземов.

Все поверхностные горизонты урбостратоземов показали удовлетворительное состояние, согласно критериям оценки по патенту Еремченко-Митраковой [4]. В целом, фитотестирование показало удовлетворительное экологическое состояние поверхностных горизонтов урбостратоземов жилых районов г. Перми.

Список цитируемой литературы

1. Ерёмченко О. З., Шестаков И. Е., Москвина Н. В. Почвы и техногенные поверхностные образования урбанизированных территорий Пермского Прикамья. Пермь: Издательство Пермского университета, 2016. 252 с.
2. Антропогенные почвы: генезис, география, рекультивация / М.И. Герасимова, М.Н. Строганова, Н.В. Можарова, Т.В. Прокофьева. Под ред. Академика РАН Г.В. Добровольского. Смоленск: Ойкумена, 2003. 268 с.
3. Прокофьева Т. В., Герасимова М. И., Безуглова О. С., Бахматова К. А., Гольева А. А., Горбов С. Н., Жарикова Е. А., Матинян Н. Н., Наквасина Е. Н., Сивцева Н. Е. Введение почв и почвоподобных образований городских территорий в классификацию почв России // Почвоведение. 2014. № 10. С. 1155-1164.
4. Еремченко О.З., Митракова Н.В. Способ оценки биологической активности и токсичности почв и техногенных почвогрунтов: пат. Рос. Федерации № 2620555. 2017.

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ АКРИЛАМИДА И ЕГО ВЛИЯНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ

Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г.

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

Ключевые слова: акриламид, генотоксичность, тест Эймса

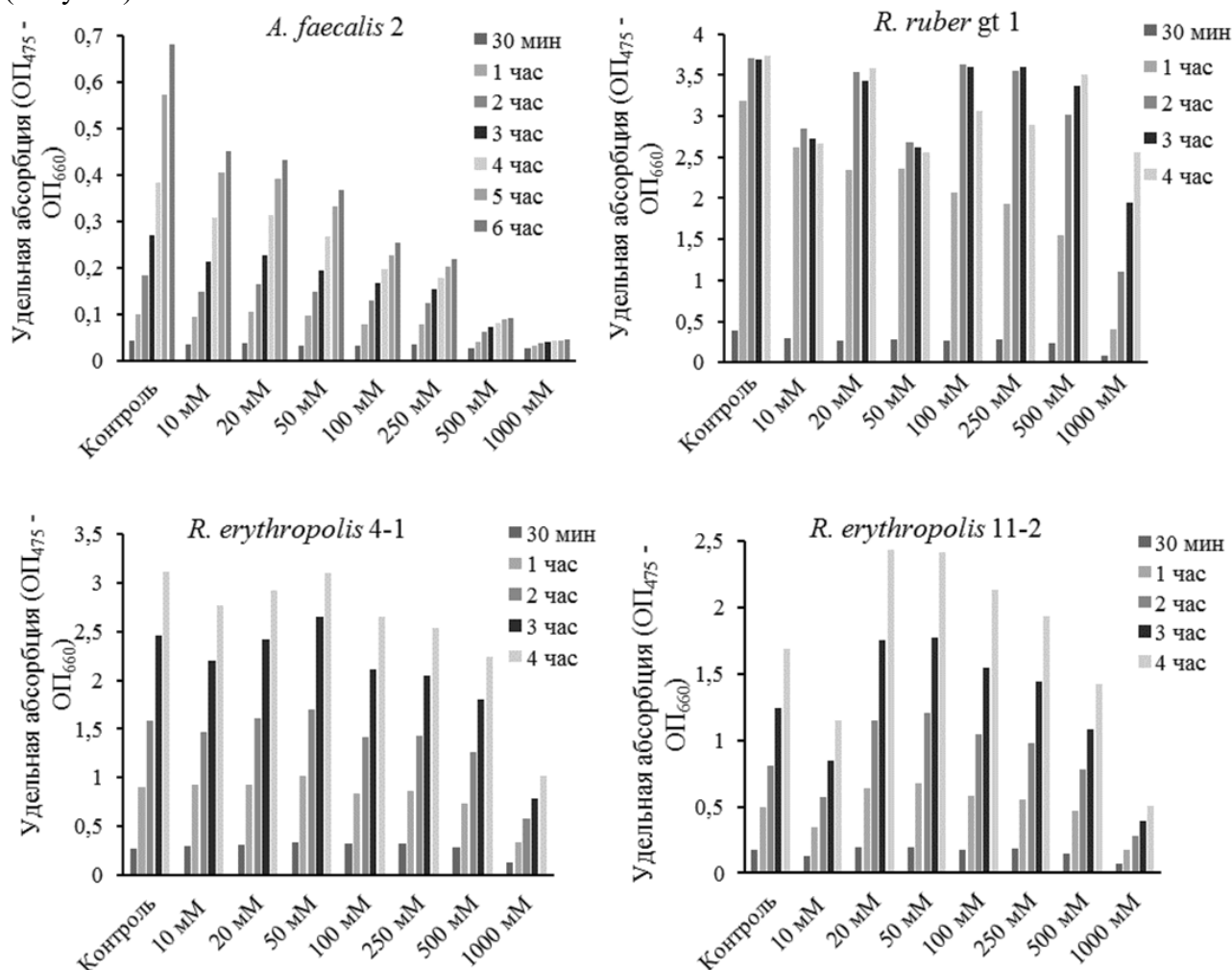
Акриламид (АА) – непредельное органическое соединение, высокотоксичное реакционноспособное вещество, которое является сырьем для производства полиакриламидных полимеров [1]. Кроме того, акриламид образуется при высокотемпературной обработке пищи, обладает канцерогенным и мутагенным действием для животных и человека [2]. Несмотря на высокую токсичность этого вещества некоторые микроорганизмы могут использовать его в качестве единственного источника углерода и/или азота [3]. Известно, что штаммы бактерий, относящиеся к родам *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Stenotrophomonas* и др., способны к биodeградации акриламида в окружающей среде [4, 5]. Тем не менее, характер токсического действия акриламида на физиологию прокариотов остается не до конца выясненным.

Цель исследования – изучить мутагенность и влияние акриламида на жизнеспособность и метаболическую активность клеток бактерий при воздействии его различных концентраций. В работе использовали штаммы *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2, *R. ruber* gt 1, *Alcaligenes faecalis* 2, *Salmonella typhimurium* TA1538 и *S. typhimurium* TA1535. Нами было исследовано влияние концентрации акриламида (10–1000 мМ) и продолжительности его воздействия на дыхательную активность клеток штаммов рода *Rhodococcus* и *A. faecalis* 2.

Для определения метаболической активности в присутствии акриламида использовали стандартный набор реактивов ХТТ Cell Proliferation Assay Kit («Roche», Germany), в состав которого входят реагент ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид) и реагент для активации (феназинметасульфат). Инкубацию клеток с добавлением активированного ХТТ-реагента проводили в 96-луночной планшете в течение 4 ч для родококков и 6 ч для алкалигенеса.

Оптическую плотность образовавшегося красителя (ярко-оранжевого формазана) в результате восстановления тетразолиевого соли в присутствии активно респираторных клеток измеряли на микропланшетном ридере Infinite M1000pro («Тесан», Швейцария) при 475 и 660 нм. Удельную абсорбцию высчитывали из разности средних значений оптической плотности исследуемых длин волн. Таким образом, интенсивность окрашивания среды в лунках пропорциональна количеству метаболически активных клеток.

Показано, что при возрастании концентрации акриламида происходит снижение дыхательной активности клеток по сравнению с контролем у большинства штаммов (Рисунок).



Влияние акриламида на дыхательную активность клеток штаммов рода *Rhodococcus* и *Alcaligenes faecalis* 2

Однако даже 1000 мМ раствор акриламида не приводил к полному подавлению метаболической активности родококков. При этом *R. ruber* gt 1 проявил наиболее высокую устойчивость, тогда как *A. faecalis* 2 был более чувствителен к данному веществу по сравнению с родококками. Для определения минимальных подавляющих и бактерицидных концентраций акриламида использовали индикаторные штаммы *S. typhimurium*. Конечные концентрации вещества составляли 0,25, 2,5, 25, 250 и 2500 мМ на чашку. Определение проводили в 2-кратной повторности для каждого штамма бактерий. Культуры с акриламидом высевали на агаризованную питательную среду ГРМ (Россия) из серийных разведений. Чашки Петри ставили в термостат при 37°C на сутки. Жизнеспособность бактериальных штаммов на среде, содержащей акриламид, была оценена подсчетом колониеобразующих единиц.

Отмечено, что данные концентрации вещества не подавляют рост изученных штаммов по сравнению с контролем.

Мутагенную активность акриламида исследовали методом стандартного теста Эймса. Для этого применили полуколичественный метод с внесением исследуемых (0,25–2500 мМ) концентраций соединения в слой полужидкого агара (без метаболической активации). Наличие мутагенного эффекта регистрировали путем учета обратных мутаций у штаммов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. В качестве позитивного контроля на штамме TA1535 использовали нитрозометилмочевину (0,1 мл/чашку), а на штамме TA1538 – 2,4-динитрофенилгидразин. Определение проводили в 3-кратной повторности для каждого штамма бактерий.

При сравнении числа колоний-ревертантов на опытных и контрольных чашках отмечено отсутствие мутагенной активности акриламида (Таблица). По результатам исследования было выяснено, что практически все изученные бактериальные штаммы устойчивы к акриlamиду. *A. faecalis* 2, являясь грамотрицательным микроорганизмом, проявил большую чувствительность, что обусловлено характерным строением клеточной стенки. Следует отметить сохранение метаболической активности клеток штаммов родококков в присутствии высоких концентраций акриламида. При этом наибольшая устойчивость *R. ruber* gt 1 связана с тем, что он является специально селекционированным штаммом и обладает высокой нитрилгидратазной активностью.

Кроме этого, акриламид не обладает выраженным бактерицидным действием по отношению к индикаторным штаммам сальмонеллы. И не обладает генотоксичностью, а именно, не индуцирует ни мутаций типа сдвига рамки считывания, характерные для штамма TA1538, ни мутаций замены пар оснований – для штамма TA1535. При сравнении с данными научной литературы [6, 7], касающимися воздействия акриламида, можно заключить, что это соединение не является сильно токсичным для бактерий. Следовательно, его токсические свойства проявляются, главным образом, по отношению к эукариотам, а не прокариотам.

Оценка мутагенной активности акриламида методом его внесения в слой полужидкого агара

Вариант опыта	Среднее число колоний на чашках при использовании тест-штаммов		Результаты оценки мутагенной активности (индексы) на штаммах	
	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1538	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535
Контроль чистый (культура+вода)	30	18	«-»	«-»
Мутаген (позитивный контроль)	1741	1739	«++»	«++»
Акриламид, 0,25 мМ	24	20	«-»	«-»
Акриламид, 2,5 мМ	30	18	«-»	«-»
Акриламид, 25 мМ	26	16	«-»	«-»
Акриламид, 250 мМ	17	20	«-»	«-»
Акриламид, 2500 мМ	10	7	«-»	«-»

Примечание: «-» – не выявлена мутагенная активность, «++» – выявлена средняя мутагенная активность.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Поиск и селекция биотехнологически перспективных микроорганизмов и создание иммунохимических диагностических систем», регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290010-7

Список цитируемой литературы

1. Tepe Y. Acrylamide in surface and drinking water // *Acrylamide in Food*. 2016. P. 275–293.
2. Duda-Chodak A., Wajda Ł., Tarko T., Sroka P., Satora P. Interactions between acrylamide, microorganisms, and food components – a review // *The Royal Society of Chemistry*. – 2016. – V. 7. – № 3. – P. 1–15.
3. Gafar A.A., Shukor M.Y. Characterization of an acrylamide-degrading bacterium and its degradation pathway // *JEMAT*. – 2018. – V. 6. – № 2. – P. 29–33.
4. Joshi S.J., Abed R.M.M. Biodegradation of polyacrylamide and its derivatives // *Environ. Process.* – 2017. – V. 4. – P. 463–476.
5. Jangkorn S., Charoenpanich J., Sriwiriyarat T. Comparative study of *Enterobacter aerogenes* and mixed-culture bacteria for acrylamide biodegradation in sequencing batch reactor wastewater-treatment systems // *J. Environ. Eng.* – 2018. – V. 144. – № 3.
6. Кнаап A.G.A.C., Kramers P.G.N., Voogd C.E., Bergkamp W.G.M, Groot M.G., Langebroek P.G., Mout H.C.A., van der Stel J.J., Verharen H.W. Mutagenic activity of acrylamide in eukaryotic systems but not in bacteria // *Mutagenesis*. – 1988. – V. 3. – № 3. – P. 263–268.
7. El-Assouli S.M. Acrylamide in selected foods and genotoxicity of their extracts // *Egypt Public Health Assoc.* – 2009. – V. 84 – № 3. – P. 369–390.

АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ ИКРЫ И ЛИЧИНОК РЕЧНОГО ОКУНЯ *PERCA FLUVIATILIS* В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

Мухина М.В.¹, Михеев П.Б.^{1,2}, Якубова К.С.¹, Бакланов М.А.¹

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия;

² ХабаровскНИРО, Хабаровск, Россия

Ключевые слова: речной окунь, техногенное засоление, температура, выживаемость икры, выживаемость личинок.

Техногенное засоление пресноводных экосистем является серьезной проблемой, поскольку приводит к образованию контрастных геохимических аномалий с повышенным содержанием водорастворимых солей на значительном удалении от источников засоления. Наиболее известными источниками антропогенного засоления являются антигололедные реагенты, содержащие натриевую соль, и разработка солевых месторождений.

Россия является одним из мировых лидеров по производству калийных и магниевых солей. Их добыча производится в Пермском крае в пределах Верхнекамского месторождения, побочным эффектом которого является техногенное засоление водной среды. Исследования химического состава воды, водорослевой флоры, зоопланктона, макрозообентоса и рыб рек бассейна Камы, подверженных засолению, показывают значительные биотические трансформации на участках рек с высокой концентрацией солей. Негативное воздействие техногенного засоления на водную биоту может быть усилено в современных условиях изменения климата.

Целью данного исследования является экспериментальная оценка выживаемости икры и личинок пресноводных рыб в условиях повышенной температуры и солености. В качестве модельного объекта использован речной окунь *Perca fluviatilis*, который является одним из наиболее распространенных видов эврибионтных пресноводных рыб в бореальной водной среде. Для эксперимента были взяты икра и личинки вида, как наиболее чувствительные стадии развития, для которых характерна наибольшая смертность.

В качестве материала для эксперимента использовалась икра окуня на стадии перед вылуплением. Икра была собрана 18 мая 2021 г. на мелководьях Мотовилихинский пруда в черте г. Перми. Температура воды в месте отбора проб составляла 17°C. После доставки икры в лабораторию и её акклиматизации в течение 12 часов, икру погружали в пять прозрачных контейнеров с 10 литрами воды с различной концентрацией хлорида натрия. Первый контейнер был заполнен прудовой водой с минерализацией 0,15 г/л. В остальные четыре контейнера постепенно добавляли раствор NaCl до достижения 5 г/л, 10 г/л, 15 г/л и 20 г/л минерализации. Эксперимент проводился в условиях комнатной температуры.

Температуру измеряли дважды в день утром и вечером. Минерализация измерялась анализатором Aquameter с блоком датчиков Aquaprobe-2000. Через 48 часов воду из каждого экспериментального резервуара фильтровали для сбора икры и личинок, которые фиксировали формалином, маркировали и обрабатывали позже под стереомикроскопом. Затем подсчитывали количество икринок и вылупившихся личинок для каждого из резервуаров. Личинки, погибшие после вылупления, подсчитывались отдельно от личинок, которые были живы до конца эксперимента (рис. 1). Также учитывались морфологические аномалии и изменение размеров выживших личинок.

Температура воды во время эксперимента колебалась в пределах 21,7-23,4°C при среднем значении 22,5 ° C. В первые часы после начала эксперимента наблюдалось массовое вылупление личинок из икры. Не вылупилось только следующее количество икры: 3 из 721 при минерализации 10 г/л, 3 из 262 при минерализации 15 г/л и 1 из 234 при минерализации 20 г/л. Самая высокая смертность личинок окуня после вылупления наблюдалась при самой высокой солености. В резервуаре с естественной минерализацией смертность личинок была самой низкой (рис. 2). Снижение выживаемости вылупившихся личинок окуня с увеличением минерализации было статистически значимым ($p = 0.007$).

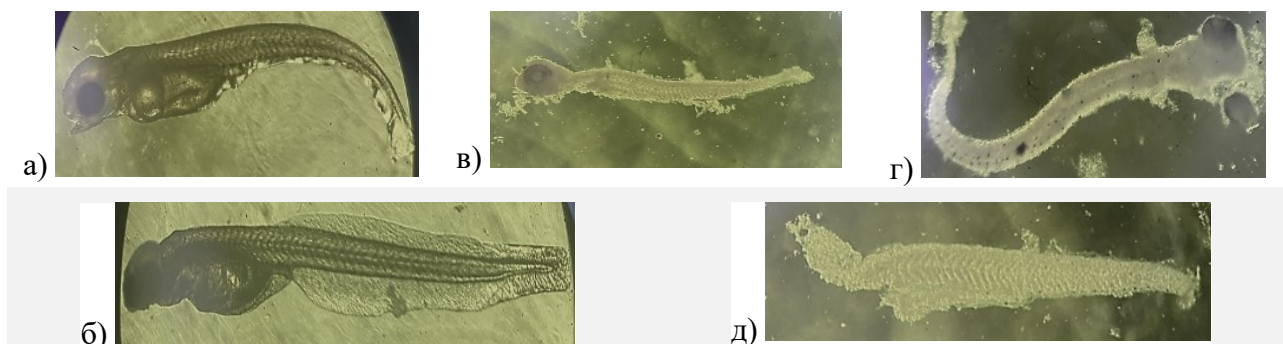


Рисунок 1 – Личинки окуня, зафиксированные в формалине после эксперимента и считавшиеся живыми до конца эксперимента (а, б), и умершие вскоре после вылупления (в, г, д), о чем свидетельствует частичное разложение их тканей

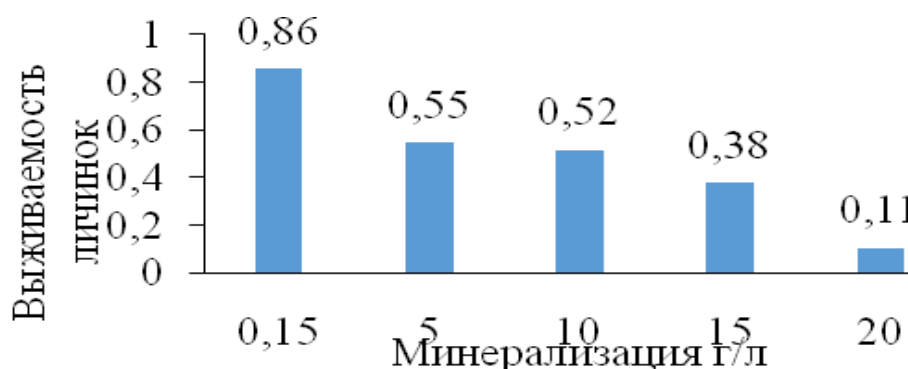


Рисунок 2 – Выживаемость личинок окуня после вылупления в условиях различной солености и экспозиции 48 часов

Личинки, вылупившиеся при естественной солёности, характеризовались наименьшей вариацией длины тела, а также наименьшей встречаемостью морфологических аномалий по сравнению с личинками, вылупившимися в условиях минерализации выше нормы.

Результаты исследования свидетельствуют об увеличении смертности личинок окуня при повышенной солёности, а также о способности икры окуня вылупляться при температуре и солёности выше нормы. Температура во время эксперимента была выше нормы для нереста и раннего развития вида. Согласно опубликованным исследованиям, окунь характеризуется широким диапазоном оптимальных температур для нереста, который лежит между 8°C и 15°C, но также нерест может происходить при 5°C и 19°C [3, 2, 6]. Из-за влияния высокой температуры во время эксперимента стрессовый эффект солёности может быть увеличен [7], и в эксперименте ожидалась полная смертность икры и личинок в условиях высокой минерализации. Но даже при самой высокой концентрации NaCl, используемой в эксперименте, доля не вылупившихся икринок была незначительной, и 11% личинок были способны переносить солёность 20 г/л. Это значительно превышает солёность в 12 г/л, которая ранее была самой высокой использованной в исследованиях *in vivo*, и демонстрирует экологическую пластичность речного окуня.

Высокая встречаемость морфологических аномалий, а также высокая изменчивость размеров личинок свидетельствуют о высоком негативном влиянии засоления на раннее развитие окуня, а также об экологической толерантности и способности вида адаптироваться к изменениям окружающей среды. Результаты согласуются с предыдущими исследованиями чувствительности ранних стадий развития рыб и амфибий к высокой солёности, приводящей к высокой доле деформаций развития, что было подтверждено экспериментально для атлантического лосося *Salmo salar* [5] и тритона *Taricha granulosa* [4]. Увеличение вариации размеров тела в условиях повышенной солёности согласуется с выводами, полученными при изучении влияния высоких концентраций катионов Ca²⁺, Mg²⁺ и Na⁺ на изменчивость размеров тела сеголетков плотвы [1]. Это может свидетельствовать о значимости размера тела как селективного признака при адаптации к условиям высокой солёности и температуры.

Результаты этого пилотного проекта показывают возможность икры и личинок окуня выживать при температуре до 23,4 °C и солёности до 20 г/л, что значительно выше видовой нормы. Это значительно выше солёности, о которой ранее сообщалось в исследованиях *in vivo*, и демонстрирует экологическую пластичность окуня. Высокая смертность, частота встречаемости деформаций развития, а также высокая изменчивость размеров личинок свидетельствуют как о высоком негативном влиянии засоления на выживаемость и раннее развитие, так и о способности окуня адаптироваться к изменениям окружающей среды.

В дальнейшем планируется разработка экспериментальной работы по влиянию множественных стрессоров на раннее развитие и выживание ранних стадий жизни рыб.

Список цитируемой литературы

1. Котеков Б.Г. Влияние повышенного содержания CA²⁺, MG²⁺ И NA⁺ на изменчивость числа пор в краниальных каналах боковой линии у мальков плотвы // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2020. – №2. – С. 128–135.
2. Gillet C., Dubois J.-P. Effect of water temperature and size of females on the timing of spawning of perch *Perca fluviatilis* L. in Lake Geneva from 1984 to 2003 // Journal of Fish Biology – 2007. – 70. – P. 1001. –1014.
3. Guma'a S.A. The effects of temperature on the development and mortality of perch, *Perca fluviatilis* // Freshw. Biol. – 1978. – 8: 221-227.
4. Hopkins G.R., French S.S., Brodie E.D. Increased frequency and severity of developmental deformities in rough-skinned newt (*Taricha granulosa*) embryos exposed to road deicing salts (NaCl & MgCl₂) // Environ Pollut. – 2013. – 173: 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.envpo.2012.10.002>

5. Mahrosh U., Kleiven M., Meland S., Rosseland B.O., Salbu B., Teien H.C. Toxicity of road deicing salt (NaCl) and copper (Cu) to fertilization and early developmental stages of Atlantic salmon (*Salmo salar*) // J. Hazard Mater. – 2014. – 280: 331–339. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.07.076. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25179105.
6. Souchon Y., Tissot L. Synthesis of thermal tolerances of the common freshwater fish species in large Western Europe rivers // Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems. – 2012. – 03.
7. Walker R.H., Smith G.D., Hudson S.B., French S.S., Walters A.W., Warmer temperatures interact with salinity to weaken physiological facilitation to stress in freshwater fishes // *Conservation Physiology*. – Vol. 8, – Issue 1. – 2020. – coaa107. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa107>

ПРИРОДОПОДОБНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ОСВОЕНИЯ ТЕХНОГЕННО-МИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ

Наумов В.А.^{1,2} Наумова О.Б.², Брюхов В.Н.^{1,2}, Голдырев В.В.^{1,2}, Мозитова К.И.^{1,2}

¹Естественнонаучный институт Пермского государственного национального
исследовательского университета, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: природоподобные технологии, техногенно-минеральные образования

Разработана новая концепция по отношению к отходам горного производства (техногенно-минеральным образованиям – ТМО), которые рассматриваются как неизученный и неиспользуемый ресурс при отработке месторождений полезных ископаемых [8, 12]. Перспективы отработки ТМО определяются их широчайшим распространением на территории земли и необходимостью их использования или утилизации. ТМО содержат значительный объем ценных компонентов и формируют новую оболочку земли – техносферу. Масса техносферы по разным оценкам уже составляет одну миллионную часть массы земной коры и с каждым годом увеличивается в геометрической прогрессии. Использование вещества техносферы и вовлечение его в хозяйственный оборот возможно на экономически выгодной основе с учетом процессов формирования ТМО (техногенеза), преобразования вещественного состава геологическими процессами (техногеогенеза), управления формированием значимых концентраций ценных компонентов (технорудогенеза) и освоением вещества ТМО как комплексного минерального сырья в твердом и жидком виде.

Концепция основана на знании и учете фундаментальных геологических процессов техногенеза и техногеогенеза, управлении формированием концентраций полезных компонентов в техногенных осадках, выделении рудосодержащих концентратов и использовании безрудной части отвалов [8, 2]. Практическая реализация концепции базируется на использовании природоподобных технологий разрушения, переноса и аккумуляции вещества ТМО.

Понятие «природоподобные технологии» введено М.В. Ковальчуком [16] в результате анализа через понятие конвергентности (сближения) знаний, полученных разными отраслями наук. Где наука сводит все части разрозненных знаний разных отраслей в единую общую – осознанно природоподобную систему. Все созданное рукотворное (техногенное) должно пройти естественный отбор и осознанно сохранится то, что отвечает принципам жизнестойкости, равновесия и гармонии с природой.

В своем выступлении на 70-й сессии Генеральной Ассамблеи ООН в Нью-Йорке (28.09.2015) президент РФ В.В. Путин говорил «о внедрении принципиально новых природоподобных технологий, которые не наносят урон окружающему миру, а существуют с ним в гармонии и позволят восстановить нарушенный человеком баланс между биосферой и техносферой. Это действительно вызов планетарного масштаба».

Наш анализ горно-геологической деятельности человечества позволил расширить это понятие. Мы рассматриваем природоподобные или техногеогенные процессы изменения геологической среды как эндогенные и экзогенные геологические процессы, активированные человеком. Они сегодня проявляются повсеместно как новый этап развития ноосферы, техносферный этап. Однако изучению этих процессов практически не уделяется внимание. Вместе с тем эти неосознанные нами процессы управляемые.

Результаты геологической деятельности «человека, вооруженного техникой» и активировавшего техногеогенные процессы (преобразование вещества и пространства в техногенных образованиях, возникающие на границе взаимодействия лито-, био-, гидро-, атмо- и социосферы) потрясающие. С точки зрения жизнедеятельности они приводят как к негативным, так и позитивным изменениям, и последствиям для человека. Использование новых знаний проявления техногенно активированных процессов, их управляемость в горно-геологической деятельности позволяют формировать экономически выгодные для освоения концентрации полезных компонентов или использовать законы их преобразования для получения веществ с заданными характеристиками состава и свойств. Человечество неосознанно запустило механизмы работы "заводов в недрах". Задача – научиться управлять этими механизмами в рамках естественно протекающих в природных системах геологических процессах и создавать необходимые продукты за счет использования природных закономерностей поведения вещества и пространства в новых условиях техногенной среды.

Природоподобные технологии в соответствии с типом литогенеза зоны размещения ТМО определяют геологические процессы и направление их протекания; обеспечивают создание условий их протекания в определенное время и в определенном месте; интенсивность протекания (усиление или замедление) природных геологических процессов; изменение состояния (твердая, жидкая фаза) в соответствии с последующей системой извлечения или утилизации получаемых продуктов.

Природоподобные технологии направлены на:

1. Доизвлечение полезных компонентов в твердой и гидроминеральной фазе;
2. Перевод полезных продуктов вещества в состояние наиболее выгодное для его промышленного извлечения;
3. Вовлечение в промышленный оборот максимально полного объема извлекаемого и перерабатываемого рудного и безрудного материала месторождения и технологических вод, образующихся в результате его освоения;
4. Обеспечение экологической безопасности размещения разделенных продуктов.

Технологии находятся в стадии апробации и обосновании их масштабного использования. Частичная апробация технологических решений выполнена на объектах россыпной и рудной золотодобычи [6, 7], переработки руд железа, цветных металлов, стекольных песков [13-15] и стеклокристаллических материалов из базальтов [4, 5].

Природоподобные технологии в классическом понимании можно рассматривать как технологии предобогащения или подготовки рудного вещества к обогащению по известным и отработанным на практике технологическим схемам, способам нейтрализации или утилизации складированного, или отработанного вещества месторождений. Системно в виде групп их можно представить следующим образом:

1 Группа. Природоподобные технологии усиления (снижения) процессов разрушения вещества ТМО; они направлены на высвобождение полезных компонентов в результате воздействия на них физических, физико-химических, химических, биохимических, биологических природных процессов, характерных для определенного типа литогенеза и

климатической зоны (пример, криогенез, испарительный и иные физико-химические и геохимические барьеры и др.).

2 Группа. Природоподобные технологии создания условий для интенсификации фазовых переходов минерального вещества из твердой фазы в жидкую, в благоприятные для извлечения отработанными технологиями формы нахождения [9].

3 Группа. Природоподобные технологии управления переносом вещества в разных формах нахождения и фазовом состоянии вещества.

4 Группа. Природоподобные технологии управления процессами осаждения, агрегации, аккумуляции полезных компонентов на основе физико-химических, биохимических и биологических процессов.

Каждая группа природоподобных технологий содержит в себе потенциал разработки технологических решений, которые могут быть реализованы как результаты интеллектуальной деятельности в виде патентов, полезных моделей, способов и методик. В части реализации этого положения нами получен Патент на полезную модель «Сорбционный модуль для извлечения золота» [1].

Из безрудной части ТМО можно изготовить инновационную продукцию разного назначения: сварочные плавненные флюсы на оксидно-силикатной и алюмосиликатной основе, каменное литье и продукцию со стеклообразной и стеклокристаллической структурой, материалы и конструкции бронепреград и защиты от поражения [3-5, 11].

Природоподобные технологии совмещаются в единый технологический цикл с отработанными технологиями получения концентратов ценных минералов (гравитационными, флотационными, электромагнитными, электрическими и другими физико-химическими и биохимическими) в твердой и жидкой (гидроминеральной) фазе [1, 10]. Наиболее эффективное сочетание достигнуто при использовании природоподобных технологий с гравитацией для твердой минеральной фазы [10, 12] и сорбцией для гидроминеральной фазы [1].

Список цитируемой литературы

1. Брюхов В.Н., Голдырев В.В., Наумов В.А., Мовзитова К.И. Сорбционный модуль для извлечения золота // Патент на полезную модель 197815 u1, 29.05.2020. Заявка № 2020106373 от 10.02.2020.
2. Игнатова А.М. Физико-химические закономерности получения и применение литых стеклокристаллических материалов шпинелид-пироксенового состава из природного и техногенного сырья // Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук, Томск, 2019. 368 с.
3. Игнатова А.М., Артемов А.О. Аналитический обзор современных и перспективных материалов и конструкций бронепреград и защит от поражения // Фундаментальные исследования. 2012. № 6-1. С. 101-105.
4. Игнатова А.М., Игнатов М.Н., Верещагин В.И. Литой стеклокристаллический материал. Патент на изобретение RU 2713170 C1, 04.02.2020. Заявка № 2019122209 от 11.07.2019.
5. Игнатова А.М., Наумов С.В., Игнатов М.Н., Пушкин С.А., Суслов С.Б. Оценка пригодности и доступности базальтоидных и габброидных комплексов западного Урала (Пермский край) для производства сварочных материалов // Вестник Пермского государственного технического университета. Машиностроение, материаловедение. Пермь, 2010. Т. 12. № 4. С. 104-116.
6. Макаров В.А. Геолого-технологические основы ревизии техногенного минерального сырья на золото. Красноярск: ООО «Поликом», 2001. 132 с.
7. Мирзеханова З.Г., Мирзеханов Г.С., Дебелая И.Д. Техногенные образования россыпных месторождений золота: ресурсно-экологические аспекты отработки. Хабаровск, ДВО РАН, 2014. 297 с.
8. Наумов В.А. Минерагения, техногенез и перспективы комплексного освоения золотоносного аллювия. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора геолого-минералогических наук / Пермский государственный университет. Пермь, 2010. 42 с.

9. Наумов В.А., Фиоруччи А., Брюхов В.Н., Голдырев В.В., Мовзитова К.И., Фетисов В.В. Техногенно-минеральные образования и воды некоторых месторождений северной Италии // Международный научно-исследовательский журнал. 2019. № 12-1 (90). С. 142-147.
10. Наумов В.А., Фиоруччи А., Голдырев В.В., Брюхов В.Н., Фетисов В.В. Научные основы управления геологическими процессами в техногенно-минеральных образованиях // Международный научно-исследовательский журнал. 2018. № 9-1 (75). С. 89-92.
11. Наумов С.В., Артемов А.О., Щицын Ю.Д., Игнатова А.М., Белоусов К.И. Способ получения гранулированного сварочного флюса. Патент на изобретение RU 2716344 С1, 11.03.2020. Заявка № 2019107319 от 14.03.2019.
12. Перепелицын В.А., Рывин В.М., Коротеев В.А. Техногенное минеральное сырье Урала. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2013. 332 с.
13. Прокопьев С. А. Технология стадийного выделения магнетитового концентрата с помощью винтовой сепарации: диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук: 25.00.13 «Обогащение полезных ископаемых»: защищена 30.05.2019; Уральский государственный горный университет, Магнитогорский государственный технический университет им. Г. И. Носова. – 2019. – 161 с.
14. Прокопьев С. А., Пелевин А. Е., Напольских С. А., Гельбинг Р. А. Стадийное выделение магнетитового концентрата с использованием винтовой сепарации // Обогащение руд. С.-Петербург, 2018. № 4. (376). С. 28-33.
15. Прокопьев С. А., Пелевин А. Е., Прокопьев Е. С., Иванова К. К. Повышение комплексности использования железорудного сырья с помощью винтовой сепарации // Известия вузов. Горный журнал. 2019, № 6. – С. 70-80.
16. Kovalchuk M.V., Naraikin O.S., Yatsishina E.B. Nature-like technologies: new opportunities and new challenges // Вестник Российской академии наук. – 2019. – Vol. 89. – N. 5. – P. 455-465. doi: 10.31857/S0869-5873895455-465

СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИАМИНОВ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI*, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ ИНДОЛА

Нестерова Л.Ю.^{1,2}, Ахова А.В.^{1,2}, Ткаченко А.Г.^{1,2}

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

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: индол, сигнальные молекулы, полиамины, антибиотикочувствительность.

Антибиотикорезистентность бактерий в последнее время является одной из самых актуальных медицинских проблем во всем мире. Во многих случаях устойчивость является результатом активности определенных специфических белков, модифицирующих антибиотики, усиливающих их выброс из клетки, уменьшающих проницаемость клеточной оболочки и выполняющих другие функции [1]. В изучении молекулярных механизмов антибиотикостойчивости достигнут значительный прогресс, однако в некоторых случаях механизмы пониженной чувствительности микроорганизмов к действию антибактериальных препаратов остаются неясными. Особенно это касается неспецифических механизмов низкоуровневой устойчивости, которая позволяет бактериальным клеткам выживать в первые минуты действия антибиотиков и при невысоких концентрациях антибактериальных препаратов.

В последнее время значительное внимание привлечено к изучению антибиотикотолерантности, опосредованной малыми молекулами, которые могут продуцироваться самими бактериальными клетками или присутствовать в среде обитания, в том числе и в тканях макроорганизма [2]. Среди таких метаболитов обращают на себя внимание такие регуляторы жизненно-важных физиологических процессов как полиамины, которые присутствуют в клетках большинства живых организмов. Бактериальные клетки продуцируют такие полиамины как путресцин, кадаверин, иногда спермидин, в то время как эукариотическими клетками в значительных количествах синтезируются спермин и спермидин. Эти биогенные поликатионы участвуют в регуляции транспорта, биосинтеза белка, репликации, транскрипции [3]. Помимо этого, известна их роль в адаптации микроорганизмов к действию антибактериальных препаратов, окислительного стресса, теплового шока и других стрессовых воздействий [4]. Недавно было продемонстрировано влияние полиаминов на работу системы ощущения кворума у грамотрицательных бактерий, в основе которой лежит продукция сигнальных молекул [5].

Изучение сигнальных молекул и процессов, которые находятся под их контролем, в настоящее время является одной из самых актуальных направлений микробиологии. Эти малые молекулы принимают участие в регуляции важных физиологических процессов, опосредуют межклеточные взаимодействия и выполняют функции передачи информации на внутри- и межвидовом уровне. Среди подобных соединений особый интерес вызывает индол, который синтезируется многими бактериальными клетками, в том числе симбионтами и патогенами человека и животных, и оказывает влияние на вирулентность, биопленкообразование, устойчивость клеток к действию различных неблагоприятных факторов [2].

Известно, что регуляторные молекулы могут оказывать взаимное влияние на уровне синтеза и/или регуляции активности и обеспечивать за счет этого адекватное функционирование адаптационных механизмов в ответ на действие различных факторов. Однако сведений о взаимовлиянии биогенных полиаминов и индола в настоящее время нет. Целью работы является изучение взаимного влияния индола и полиаминов и его роли в адаптации *E. coli* к действию антибиотиков.

Материалы и методы. Эксперименты проводили с использованием генетически модифицированных штаммов *E. coli*: GGB2600, который обладает полноценной полиаминсинтезирующей системой (MG1655 DlacIZ::Dfirt_hptetAzeo-RBS1-TnluxKm) и SL60, который не способен к синтезу путресцина и спермидина (GGB2600 speAB::Spec speED::Cm speC::Tet). Данные штаммы любезно предоставлены проф. Ж.-М. Гиго из Института Пастера, Париж.

Клетки культивировали на LB бульоне (Amresco, США) или минеральной среде M9 с добавкой 0,4% глюкозы при 37°C и перемешивании 100 об/мин. В культуру добавляли гидрохлориды полиаминов (Sigma, Швейцария) в концентрациях 1 и 5 мМ и индол (Sigma, Китай) в концентрациях 100, 200 и 500 мкМ.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотиков определяли в 96-луночных полистироловых планшетах (Минимед, Россия) модифицированным методом двукратных серийных разведений (шаг между концентрациями 1,25). Концентрацию полиаминов определяли методом тонкослойной хроматографии их дансил-производных [6]. Концентрацию индола в среде измеряли методом ВЭЖХ [7]. Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0 ("StatSoft Inc.", США). Данные представлены в виде: среднее (\pm станд. откл.).

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что как биогенные полиамины, так и индол способны оказывать влияние на антибиотикочувствительность микроорганизмов [4, 8, 9]. Индол, в свою очередь, может взаимодействовать с другими регуляторными молекулами [10]. Исходя из этого, мы изучили антибиотикочувствительность штаммов *E. coli*, различающихся по способности к синтезу полиаминов в присутствии индола. Показано, что чувствительность бактерий к антибиотикам левофлоксацину (фторхинолоны), цефотаксиму

(бета-лактамы) и амикацину (аминогликозиды), в присутствии 500 мкМ индола у полиамин-профицитного штамма снижалась в 2; 1,75 и 3,5 раза соответственно при культивировании на глюкозо-минеральной среде. Тот же показатель у штамма, дефицитного по синтезу путресцина и спермидина уменьшался по сравнению с контролем в 1,5 раза для левофлоксацина и цефотаксима и в 1,25 раза для амикацина. Эффект индола практически во всех случаях зависел от его концентрации в среде. В то же время он сильнее проявлялся при культивировании на среде М9, чем на богатой питательной среде LB. Это, возможно, обусловлено наличием в LB бульоне большого количества триптофана – предшественника индола, которое приводит к высокому содержанию в среде индола, что маскирует эффект его экзогенных добавок. Более выраженное действие индола на устойчивость к антибиотикам у штамма с полноценной системой синтеза полиаминов, по сравнению с полиаминдефицитным, дает основание предположить, что индол может оказывать действие на антибиотикочувствительность посредством влияния на синтез биогенных полиаминов, которые участвуют в защите клеток от антибиотиков.

Эти данные послужили основанием для изучения влияния индола на содержание полиаминов в клетках *E. coli*. Присутствие в среде индола в близких к физиологическим концентрациях приводило к увеличению содержания в клетках путресцина и спермидина, но не кадаверина. Количество путресцина к 8 часу культивирования в присутствии 200 мкМ индола возрастало по сравнению с контролем более чем в 1,5 раза и составляло 66,98 ($\pm 3,90$) нмоль/мг АСБ, в то время как в контрольной культуре этот показатель составлял 40,42 ($\pm 3,38$) нмоль/мг АСБ. В наибольшей степени индол увеличивал накопление спермидина. Концентрация этого полиамина после 2 часов культивирования в присутствии индола почти в 2,5 раза превышала контрольный уровень и составляла 23,92 ($\pm 1,81$) нмоль/мг АСБ (в контрольной культуре 10,51 ($\pm 5,08$) нмоль/мг АСБ). Заметного изменения содержания кадаверина в клетках *E. coli* в присутствии индола в наших экспериментах зафиксировано не было.

Известно, что из всех полиаминов, которые продуцируются бактериями, спермидин содержится в клетках в наименьшем количестве, однако именно этот поликатион оказывает наибольшее влияние на чувствительность *E. coli* к антибактериальным препаратам. Эффективность экзогенных полиаминов в отношении этого параметра уменьшается в ряду спермидин > путресцин > кадаверин [4]. Таким образом, складывается впечатление, что эффект индола на чувствительность *E. coli* к исследованным антибиотикам может быть опосредован его действием на метаболизм полиаминов.

Принимая во внимание способность биогенных полиаминов оказывать воздействие на многие метаболические процессы в бактериальных клетках, в том числе на активность аутоиндукторов системы ощущения кворума [5], было исследовано влияние полиаминов на накопление индола в культуре *E. coli*. В присутствии в среде путресцина, кадаверина и спермидина заметных изменений в содержании индола в культуральной жидкости зафиксировано не было. Статистически достоверное возрастание содержания индола наблюдалось после 3 часов культивирования с добавкой 1 мМ спермина, который не синтезируется бактериями, но может транспортироваться в клетки из окружающей среды. Однако и в этом случае эффект не был значительным и не превышал 20%.

Таким образом, показано, что способность индола снижать чувствительность *E. coli* к антибиотикам, по крайней мере, частично, обусловлена его влиянием на накопление в клетках полиаминов спермидина и путресцина.

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

Список цитируемой литературы

1. Martinez J.L. General principles of antibiotic resistance in bacteria // Drug Discov. Today Technol. – 2014. – V.11. – P. 33-39.

2. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Non-genetic mechanisms communicating antibiotic resistance: rethinking strategies for antimicrobial drug design // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2012. – V. 7. – N 10. – P. 9922-933.
3. Michael A.J. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea // *J. Biol. Chem.* – 2016. – V. 291. – N 29. – P. 14896-14903.
4. Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Yu. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics // *Res. Microbiol.* – 2012. – V. 163. – N 2. – P. 83-91.
5. Нестерова Л.Ю., Негорелова Е.В., Ткаченко А.Г. Биогенные полиамины как модуляторы активности Quorum sensing системы и биопленкообразования *Vibrio harveyi* // *Вестник Пермского университета. Сер. Биология.* – 2019. – № 3. – С. 300-308.
6. 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.
7. Kim D., Sitepu I.R., Hashidokoa Y. Induction of biofilm formation in the betaproteobacterium *Burkholderia unamae* CK43B exposed to exogenous indole and gallic acid // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2013. – V. 79 – N. 16. – P. 4845-4852
8. Han T.H., Lee J.H., Cho M.H., Wood T.K., Lee J. Environmental factors affecting indole production in *Escherichia coli* // *Res. Microbiol.* – 2011. – V. 162. – N 2. – P. 108-116.
9. Zhang S., Shao Y., Zhao X., Li C., Guo M., Lv Z., Zhang W. Indole contributes to tetracycline resistance via the outer membrane protein OmpN in *Vibrio splendidus*. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2020. – V. 36. – N 3. – С. 36.
10. Hu M., Zhang C., Mu Y., Shen Q., Feng Y. Indole affects biofilm formation in bacteria // *Indian J. Microbiol.* – 2010. – V. 50. – N 4. – P. 362-368.

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ПИТАНИЯ ХАРИУСА *THYMALLUS THYMALLUS* В ВЕРХНЕМ ТЕЧЕНИИ Р. ВИШЕРЫ (СЕВЕРНЫЙ УРАЛ)

Орлова М.С., Паньков Н.Н.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: европейский хариус, питание, р. Вишера

В составе пищи хариуса р. Вишеры обнаружено 67 компонентов животного происхождения, среди которых наземные членистоногие – 20 таксонов, и водные беспозвоночные – 47 таксонов. Наибольшее их количество зарегистрировано в весенне-летний период. К осени спектр питания хариуса становится менее разнообразным. Это связано со снижением активности наземных членистоногих и жизненными циклами массовых видов амфибиотических насекомых.

Введение. Европейский хариус *Thymallus thymallus* (Linnaeus, 1758) относится к единственному роду Хариусы *Thymallus*, а также принадлежащий к единственному семейству, населяющему пресные воды Европы. По оценкам разных специалистов в составе рода насчитывается от трех до девяти видов [1]. Хариус населяет быстрые реки с чистой, холодной водой, его можно встретить в озерах с высоким содержанием кислорода, в эстуариях и опресненных предустьевых участках морей [2]. Размеры хариуса при 1,0 кг не превышают 50 см [3]. Крупнейшим регионом сосредоточения хариуса является западный макросклон Урала и прилегающие территории Русской равнины. Здесь хариус представляет собой не только обычную рыбу, но и традиционный объект промысла [4]. С 1960-х годов хариус вызывает интерес у пермских ихтиологов [4].

С этого времени был получен колоссальный объем научной информации, в основном, о морфологической изменчивости хариуса. Эти сведения, отраженные в десятках публикаций, обобщены в монографии Е.А. Зиновьева [2012].

Среди проведенных исследований было уделено внимание и питанию хариуса. Е.А. Зиновьевым с соавторами изучено свыше 10 тыс. особей из 75 популяций этого вида в регионе, был выявлен состав пищи, прослежена суточная ритмика питания, его размерно-возрастная и биотопическая изменчивость, сезонная и годовая динамика [4].

Материалы и методы. В основу работы положены результаты обработки 111 желудков хариусов, отловленных в период открытой воды (с мая по октябрь) в 2016-2018 гг. на двух участках реки Вишеры – в районе устья р. Мойвы и Лыпы. Вся рыба была добыта научным сотрудником Вишерского заповедника И.И. Кропачевым. Камеральная обработка содержимого желудков проводилась в лаборатории гидробиологии кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии. Пауки идентифицированы проф. С.Л. Есюниным, моллюски – ст. преп. Н.Б. Овчанковой. Правильность идентификации прочих беспозвоночных проверена проф. Н.Н. Паньковым.

Результаты и обсуждение. В составе пищи европейского хариуса р. Вишеры было обнаружено 67 компонентов животного происхождения, среди которых фигурировали наземные членистоногие (20 таксонов) и водные беспозвоночные (47 таксонов).

Наземные членистоногие были представлены крылатыми стадиями амфибиотических насекомых (отряды Plecoptera, Trichoptera, Ephemeroptera, некоторые Diptera), а также облигатно наземными Diptera, Hemiptera, Coleoptera, Orthoptera, Hymenoptera. Наряду с ними, в составе рациона отмечены пауки Araneae. Среди водных беспозвоночных отмечены личинки насекомых из отрядов Plecoptera, Trichoptera, Ephemeroptera, Diptera, Megaloptera, малощетинковые черви Oligochaeta, двустворчатые моллюски Bivalvia и брюхоногие моллюски Gastropoda. Анализ материала позволил выявить особенности сезонной динамики спектра питания хариуса.

В начале вегетационного сезона в составе пищи хариуса чаще всего встречались мухи (94,4%). Обычным компонентом рациона были личинки подёнок *Baetis* (24,3%), комаров-звонцов *Chironomidae* (18,9%) и веснянок *Diura bicaudata* (17,2%). Наряду с ними, отмечены личинки подёнок *Heptagenia sulphurea* и *Ephemera danica*, вислоккрылок *Sialis*, ручейников *Micrasema gelidum*, *Potamophylax latipennis*, *Arctopsyche ladogensis*, *Mystacydes* sp., *Rhyacophyla nubila*, *Polycentropus flavomaculatus* и *Anabolia* sp., веснянок *Capnia* sp., жуков-плавунцов *Platambus maculatus*, двукрылых (семейства *Simuliidae*, *Ceratopogonidae*, *Myscidae*, *Tipulidae*), пауки рода *Tetragnatha* (5,6%).

В разгар лета состав пищи хариуса был столь же разнообразен. Воздушная фракция характеризовалась преобладанием таких насекомых, как комары-горбатки (55,6%), мухи (15,9%), тля (9%), цикады (6,3%), ручейники (3,7%). Среди компонентов водной фракции часто встречались личинки подёнок *Baetis* (42,1%), комаров-звонцов *Chironomidae* (17,8%), имаго и личинки жуков *Elmis* (12,3% и 5,8% соответственно). Единично отмечены личинки ручейников *P. latipennis*, *A. ladogensis*, *Mystacydes* sp., *R. nubila*, *P. flavomaculatus* и *Anabolia* sp., веснянок *Capnia* sp., поденок *E. danica*, жуков-плавунцов *P. maculatus*, пауки *Philodromus cespitum* и *Philodromus emarginatus*.

В осенний период в составе рациона хариуса из компонентов воздушной фракции часто встречались веснянки *Leuctra fusca* (90%). Наряду с ними, отмечены имаго ручейников (6,7%). Из числа гидробионтов преобладали личинки ручейников *Apatania* (69,9%) и комаров-звонцов *Chironomidae* (14,7%). Им сопутствовали личинки жуков *Elmis*, веснянок *Taeniopteryx nebulosa* и *Isoperla obscura*, подёнок *Caenis macrura*, ручейников *Arctopsyche ladogensis*, *Ceraclea* sp. и *Brachycentrus subnubilis*, а также моллюски *Sphaerium corneum*.

Таким образом, к осени спектр питания хариуса становится менее разнообразным. С одной стороны, это связано со снижением активности наземных членистоногих, практически полностью исчезающих из пищевого спектра. С другой – с жизненными циклами массовых видов амфибиотических насекомых, большая часть из которых завершается в

летний период, так что осенью они представлены молодыми личинками. В то же время, в питании хариуса появляются формы, несвойственные для весны и лета. Это имаго веснянок *L. fusca*, вылетающих осенью, и нимфы *T. nebulosa*, развивающиеся в холодное время года.

Список цитируемой литературы

1. Макоедов А.Н. Родственные отношения хариусовых Сибири и Дальнего Востока // Москва, 1999. – 107 с.
2. Peterson, H.H. The Grayling, *Thymallus thymallus* (L.), of the Sundsvall Bay area. Institute of freshwater research, Drottningholm. 1968 – 48, 36-56.
3. Расс Т.С. Жизнь животных. Рыбы. Т.4 часть 1 // Просвещение. Москва, 1971 – 710 с.
4. Зиновьев Е.А. Экология хариусов Пермского Прикамья // Пермь: Изд-во Перм. гос. ун-та, 2012 – 444 с.

ЖИВОТНОЕ НАСЕЛЕНИЕ ПЕЩЕР ПЕРМСКОГО КРАЯ

Паньков Н.Н.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: Пермский край, пещеры, животное население.

Первые сведения о животных – обитателях подземных пустот Пермского края относятся к концу XVIII века, когда Н.П. Рычков, посетив в 1770 году Дивью пещеру, констатировал в ней «... великое множество... летучих мышей, имеющих посреди каменных развалин свои жилища» [1].

Последующие работы, посвященные изучению животного населения карстовых полостей региона (XIX век) связано с именами И.Ф. Брандта, Э. Эверсманна, Х. Мозеля, Н.П. Булычева, Л.П. Сабанеева, И.Я. Словцова и С.И. Сергеева, чье внимание также ограничилось рукокрылыми, как наиболее массовыми и заметными представителями региональной спелеофауны. В XX веке летучие мыши Пермского края исследовались С.И. Огневым, А.Г. Вороновым, Е.М. Воронцовым, П.П. Стрелковым, С.П. Чащиным, Г.Н. Панариной, М.П. Тиуновым, Д.В. Наумкиным. Таким образом, к началу XXI века рукокрылые региона были изучены достаточно полно [2].

Этого нельзя сказать о других животных – обитателях пещер Пермского края. Так, прочие группы позвоночных в карстовых полостях региона специально никогда не изучались, хотя эпизодические встречи с ними неоднократно описывались в литературе [3,4]. Что касается беспозвоночных, то первые упоминания о них принадлежат столичному гидробиологу П.Н. Каптереву [5], посетившему Прикамье с целью изучения крупных пещер на предмет наличия в них живых организмов. Среди ранних работ, посвященных беспозвоночным карстовых полостей региона, следует отметить статью Е.В. Боруцкого [6] с описанием нового вида бокоплавов из голарктического рода *Crangonyx*. Впоследствии беспозвоночные эпизодически наблюдались в Кунгурской ледяной пещере, что фиксировалось в научных отчетах Кунгурского стационара ГИ УрО РАН, а также в ряде печатных работ [7]. Существенный вклад в познание фауны беспозвоночных подземных пустот внесло изучение паразитов рукокрылых [8].

В основу настоящей работы положены результаты анализа оригинальных материалов, собранных в ходе 186 посещений 56 пещер Пермского края с августа 2002 г. по январь 2019 г. Объем материала составляет 948 проб, количество пойманных животных достигает 3386 экз. Наряду с оригинальными, обобщены литературные сведения. К настоящему времени из пещер Пермского края известно 115 видов и форм беспозвоночных и 24 вида позвоночных животных.

Из беспозвоночных наиболее разнообразно представлены насекомые (60 видов и форм) и паукообразные (40), наряду с ними зарегистрированы ракообразные (5), многоножки (5), брюхоногие моллюски (2), кольчатые (2) и круглые (1) черви. Из 11 отрядов насекомых особенно богаты видами двукрылые (23). Заметную роль в сложении спелеофауны играют жуки (9), бабочки (7) и перепончатокрылые (6). Ногохвостки, поденки, веснянки, ручейники, вислоккрылки, клопы и блохи насчитывают по 1-4 таксона. Основу списка паукообразных составляют пауки (26). Наряду с ними зарегистрированы акариформные (2) и паразитиформные (10) клещи и сенокосцы (2). Среди позвоночных животных зарегистрированы рыбы (5 видов), амфибии (3), птицы (1) и млекопитающие (15). Основу списка последних составляют летучие мыши (9). Им сопутствуют грызуны (3) и хищные (3).

Среди животных – обитателей пещер Пермского края может быть выделено несколько экологических групп. Группу *эутроглобионтов* составляют, по-видимому, только *S. chlebnikovi*, морфологически приспособленные к пещерному образу жизни. Эти рачки постоянно обитают в подземных озерах и лишь случайно оказываются в поверхностных водах.

Группа *гемитроглобионтов* насчитывает 26 видов и форм; эти животные встречаются как в пещерах, так и в некоторых биотопах на поверхности земли (под камнями, в лесной подстилке, почве), сходных с пещерами по основным характеристикам среды, таким, как наличие детрита, отсутствие света и высокая влажность. Экологическими предпосылками к гемитроглобионтности можно считать скрытный образ жизни, поли- или детритофагию, хищничество и паразитизм. Из представителей спелеофауны Пермского края к числу гемитроглобионтов относятся черви, мокрицы, некоторые пауки, многоножки, ногохвостки и жуки. По-видимому, к этой же группе можно отнести и клещей, паразитирующих на других членистоногих и летучих мышах.

Группа *псевдотроглобионтов* представлена 33 таксонами; основная часть жизненного цикла этих беспозвоночных протекает вне пещер, но они пользуются карстовыми пустотами и сходными с ними местообитаниями (шахтами, колодцами, погребам, звериными норами и т.п.) как временными укрытиями для дневки и (или) зимовки. Экологическими предпосылками к псевдотроглобионтности является ночной (сумеречный) образ жизни и (или) гигрофильность, а также некоторые особенности жизненного цикла (зимовка при положительных температурах). Наиболее характерными представителями этой группы в региональной спелеофауне являются ночные бабочки-совки, комары-гриболобки, зимние комарики, комары-болотницы, кровососущие (настоящие) комары, мухи-геломизиды и летучие мыши.

Помимо рассмотренных групп животных, экологически тяготеющих к подземным местообитаниям, в пещерах встречаются и случайные элементы – *тихотроглобионты*, или *троглоксены*. Обращает на себя внимание тот факт, что среди них преобладают нелетающие формы – дождевые черви, слизни, улитки, пауки, сенокосцы, многоножки, гусеницы бабочек, а также лягушки, жабы и тритоны (всего 21 таксон). Энергично передвигаясь по поверхности почвы или в ее толще, они либо падают в пещеры, либо забредают в них, потеряв ориентацию, и не могут выбраться обратно, будучи парализованы холодом или не в состоянии найти выход. Таким образом, пещеры служат для этих животных своеобразными ловушками.

Распределение беспозвоночных внутри пещер неоднородно. Большинство таксонов зарегистрировано в их привходовой части. Это утверждение справедливо практически для всех экологических групп спелеофауны, причем подобная картина применительно к каждой из них обусловлена разными факторами.

Так, детритоядные гемитроглобионты (мокрицы, некоторые жуки) в привходовой части пещер находят сравнительно богатую пищу в виде листового опада, кусочков древесной коры и веточек растений, поступающих сюда с поверхности. Хищные гемитроглобионты охотятся здесь на многочисленных жертв, обилие которых по направлению в глубь земных недр резко снижается. Псевдотроглобионты в этой части пещер находят подходящие им условия для

дневок и зимовок, не испытывая необходимости проникать дальше. Что касается тихотроглобионтов, не имеющих никаких биологических оснований проникать в подземные пустоты, то причины их преимущественной локализации в привходовой части пещер вполне очевидны. Лишь немногие животные постоянно встречаются в глубокой части пещер. Таковы зимние комарики Trichoceridae, комары-болотницы Limoniidae, гриболюбки Mycetophilidae и мухи Helomyzidae.

Анализ материала позволил выявить некоторые особенности сезонной динамики таксономического разнообразия спелеофауны. Количество видов гемитроглобионтов в подземных местообитаниях на протяжении всего года остается более или менее стабильным. Псевдотроглобионты демонстрируют выраженную тенденцию к увеличению своего разнообразия в холодное время года. По-видимому, это связано с уходом ряда их представителей в пещеры на зимовку. В частности, это касается мух Scatophagidae, бабочек-крапивниц *Aglais urticae* (Linnaeus, 1758), а также кровососущих комаров родов *Culex* и *Culiseta*, сравнительно малочисленных в пещерах летом и массовых – в зимний период. Особо контрастную картину являет сезонная динамика разнообразия тихотроглобионтов, демонстрирующая хорошо выраженные пики весной и осенью.

Очевидно, это объясняется резким возрастанием миграционной активности животных в межсезонье, когда они, передвигаясь по поверхности почвы в поисках зимних убежищ или, наоборот, разыскивая подходящие местообитания после зимовки, попадают в подземные пустоты как естественные ловушки. Возможно, определенное значение имеет и дезориентирующее животных выравнивание микроклиматических контрастов между подземными местообитаниями и земной поверхностью.

Список цитируемой литературы

1. Рычков Н.П. Журнал или дневные записки путешествия капитана Рычкова по разным провинциям Российского государства в 1769 и 1770 году. Спб.: Императорская Академия наук, 1772. С. 118-122.
2. Большаков В.Н., Орлов О.Л., Снитко В.П. Летучие мыши Урала. Екатеринбург: Академкнига, 2005. 176 с.
3. Паньков Н.Н., Кадебская О.И. Биология // Кунгурская Ледяная пещера: опыт режимных наблюдений / Под ред. В.Н. Дублянского. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2005. С. 238-257.
4. Старова О.С., Паньков Н.Н. Рыбы в пещерах Урала: необычные и загадочные находки // Спелеология и спелестология: развитие и взаимодействие наук. Сборник материалов международной научно-практической конференции. Набережные Челны: НГПИ, 2010. С. 322-325.
5. Каптерев П.О. О некоторых пещерах Пермской и Казанской губерний // Землеведение, 1913. Вып. 1-2. С. 169-177.
6. Borutzky E. W. Materialien über die Fauna der unterirdischen Gewässer, Crangonyx chlebnikovi sp. n. (Amphipoda) aus den Höhlen des mittleren Urals // Zool. Anz. 1928. Bd. 77. S. 253-259.
7. Паньков Н.Н., Старова О.С. К фауне и экологии беспозвоночных – обитателей пещер Пермского края // Спелеология и спелестология: развитие и взаимодействие наук. Сборник материалов международной научно-практической конференции. Набережные Челны: НГПИ, 2010. С. 315-318.
8. Орлова М.В. Фауна и экология эктопаразитов рукокрылых Урала. Автореф... канд. биол. наук. Екатеринбург, 2013. 20 с.

ХИМИЗМ ЗАСОЛЕНИЯ АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ В ЗОНАХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СОЛЕВЫХ ОТХОДОВ

Пахоруков И.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: калийное производство, вторичное засоление, аллювиальные почвы

На Верхнекамском месторождении калийно-магниевых солей складывается своеобразная экологическая обстановка. Освоение месторождения началось в 1934 г., объемы добычи на нем постоянно увеличиваются, при этом совершенствуются технологии переработки, и расширяется спектр извлекаемых солевых ингредиентов. Однако применяемые технологии переработки руд позволяют добиться извлечения полезных компонентов на уровне 27-30%, остальная добываемая горная масса – переходит в отходы. И в перспективе нагрузка на природную среду, связанная с накоплением отходов, будет возрастать.

Воздействие калийной промышленности на окружающую среду разнообразно и охватывает многие природные компоненты. В случае затопления шахт катастрофические последствия, сопровождающиеся просадками и провалами, охватывают значительную территорию. Основной спецификой калийного производства является накопление значительного количества отходов в шламохранилищах и солеотвалах с рассоло-сборниками. [1].

Соли и микропримеси, накапливаемые в отвалах, под влиянием эрозии и инфильтрации поступают со сточными водами в поверхностные водотоки. Соли из шламонакопителей за счет инфильтрации поступают в подземные воды и разгружаются в местные дрены. Все это ведет к концентрации солей и микропримесей на участках техногенного заболачивания. В ареалах рассеивания формируются участки локального солевого загрязнения, сопровождающиеся изменением реакции почвенной среды в сторону подщелачивания. Солевой стресс в сочетании с изменением pH приводит к гибели типичных таежных видов растений, однако стимулирует захват освобождающихся экотопов солеустойчивыми ассоциациями [2].

Цель исследований – изучить химизм засоления аллювиальных почв в долинах рек Ленва и Черной, испытывающих воздействие высокоминерализованных техногенных вод. В летний период 2018-2020 гг. нами проведены маршрутные исследования почв речных долин рек Ленва и Черная. Обнаружены участки пойм, характеризующиеся отсутствием растительности, либо имеющие низкое проективное покрытие с доминированием 1-5 видов солеустойчивой и солелюбивой растительности (*Puccinellia distans*, *Atriplex prostrata*, *Spergularia salina* и др.). На шести таких участках (по три на каждой из рек) были заложены почвенные разрезы до глубины водонасыщенных грунтов. Диагностика почв проведена в соответствии с современной классификацией почв [3]. В отобранных образцах почв изучали содержание ионов в водной вытяжке (в соотношении 1:5): SO_4^{2-} – весовым методом, Cl^- – аргентометрическим методом по Мору, Na^+ и K^+ – пламенно-фотометрическим методом.

Общую площадь солончаковых аллювиальных почв под изреженным растительным покровом в долине р. Черной рассчитали при помощи программы ArcMap 10.5.

Геохимическое своеобразие экологической обстановки, формирующейся в ареале промышленного воздействия Верхнекамского месторождения, обусловлено техногенным засолением, химические характеристики которого являются производными от природного состава солевой толщи. По химической принадлежности данное месторождение относится к хлоридному типу. Полезными извлекаемыми компонентами являются соли калия и магния. Серьезной экологической проблемой является образование в процессе получения товарной продукции большого объема глинисто-солевых отходов, которые размещаются в шламохранилищах и солеотвалах. В настоящее время на территории

Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей накоплено более 270 млн т галитовых отходов и более 30 млн м³ глинисто-солевых шламов [1, 4]. Почвы долины реки Черной испытывают воздействие солеотвала БКПРУ-3, образованного галитовыми отходами. Основным компонентом галитовых отходов является хлорид натрия. Кроме того, галитовые отходы содержат небольшое количество хлорида калия, хлорида магния, сульфата кальция, брома, нерастворимого остатка и некоторые другие компоненты. В галитовых отвалах, получаемых при переработке сильвинитов флотационным методом, содержится незначительное количество адсорбированных флотореагентов. Состав галитовых отходов при галургической переработке сильвинитовых руд (масс. %): NaCl – 92–96; KCl – 1,2–2,5; CaSO₄ – 0,6–2,0; MgCl₂ – 0,05–0,20; нерастворимый осадок – 0,3–3. Влажность – 5–10% [5].

Почвы долины реки Ленва главным образом находятся под воздействием шламохранилища БКПРУ-3, заполненного глинисто-солевыми шламами, которые представляют собой суспензию нерастворимого осадка в минерализованном рассоле с концентрацией 200 г/л (отношение жидкой фазы к твердой = 1,7–2,5). Состав рассола (мас. %): KCl – 10–11; NaCl – 20–22. Твердая фаза – мелкодисперсная, на 70 % состоящая из частиц размером 20 мкм [6].

Данные по среднему содержанию засоряющих ионов техногенного происхождения свидетельствуют о том, что в водной вытяжке преобладали ионы Na⁺, ионов K⁺ содержалось заметно меньше. В серогумусовом горизонте аллювиальных почв долины р. Черной между содержанием ионов Cl⁻ и SO₄²⁻ отсутствовали значимые различия; но в глеевом горизонте хлорид-ионов было в 1,5–2 раза больше, чем сульфат-ионов (таблица 1). В аллювиальных почвах долины р. Ленва хлорид-ионы содержались в значительно большем количестве, чем сульфат-ионы (таблица 2).

Химизм засоления формирующихся вторично засоленных почв зависит, по-видимому, от химического состава солевых отходов. В растворах шламохранилищ преобладают хлоридные соли, формирующиеся под их воздействием почвы долины р. Ленва, характеризуются хлоридным химизмом. Напротив, галитовые отходы солеотвалов, помимо хлоридов, содержат значительное количество сульфат-ионов, поэтому в почвах долины р. Черной, находящейся под влиянием солеотвала БКПРУ-3, формируется сульфатно-хлоридный состав солей.

Таблица 1 – Содержание засоряющих ионов в водной вытяжке из аллювиальных серогумусовых глеевых солончаковых почв долины р. Черной, смоль(экв)/кг почвы

Горизонт, глубина	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
AYs,g, ≈ 0-15 см	7,58±3,15	1,17±0,55	5,27±2,50	3,77±1,36
Gs, ≈ 15-30 см	12,29±3,43	2,35±0,49	9,43±3,25	5,07±0,50
Gs, ≈ 30-50 см	24,99±7,50	4,67±1,45	23,80±8,09	10,15±1,98

Примечание. Средние значения и стандартные ошибки (по 3 разрезам)

Таблица 2 – Содержание засоряющих ионов в водной вытяжке из аллювиальных гумусовых глееватых солончаковых почв долины р. Ленва, смоль(экв)/кг почвы

Горизонт, глубина	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
AYs,g, ≈ 0-15 см	3,56±1,18	0,68±0,29	10,28±1,24	1,60±1,06
Gs, ≈ 15-30 см	5,03±2,68	0,76±0,57	13,69±4,72	1,26±0,70
Gs, ≈ 30-50 см	8,74±5,93	1,03±0,81	17,98±6,22	1,54±0,77

Примечание. Средние значения и стандартные ошибки (по 3 разрезам)

Исследуемые аллювиальные почвы долины р. Черная были диагностированы как аллювиальные серогумусовые глеевые сульфатно-хлоридные натриевые солончаковые почвы,

а почвы долины р. Ленва – как аллювиальные гумусовые глееватые хлоридные натриевые солончаковые почвы.

Оценка масштабов развития вторичного галогенеза в долине р. Черной под воздействием техногенных минерализованных вод показала, что отчетливые признаки формирования солончаковых почв под изреженным растительным покровом прослежены на площади 17,3 га, что составляет около 16% площади речной долины [7].

На территории Березниковского калийного рудоуправления в долинах рек Черная и Ленва под воздействием техногенных минерализованных вод образовались солончаковые аллювиальные почвы. Под воздействием солей серы сформировались аллювиальные почвы с сульфатно-хлоридным натриевым химизмом, а под воздействием шламохранилища – почвы с хлоридным натриевым химизмом засоления.

Список цитируемой литературы

1. Лискова М.Ю. Негативное воздействие, оказываемое на окружающую среду предприятиями по добыче и обогащению калийно-магниевых солей // Вестник ПНИПУ. Геология. Нефтегазовое и горное дело. Пермский национальный исследовательский политехнический университет, 2017. Т.16, №1. С. 82–88.
2. Максимович Н.Г., Ворончихина Е.А. и др. Техногенные биогеохимические процессы в Пермском крае // Геориск. 2010. № 2. С. 38–45.
3. 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.
4. Бачурин В.А., Бабоско А.Ю. Эколого-геохимическая характеристика отходов калийного производства // Горный журнал. 2008. № 10. С. 88–91.
5. Ашпина О. Приключения соды. Новый век // The Chemical Journal. 2017. С. 26–28.
6. Голубцова А.Н., Карманова С.В. Оценка воздействия на объекты окружающей среды при строительстве шламонакопителя Усольского калийного комбината // Транспорт. Транспортные сооружения. Экология, 2015. №3. С. 20–34.
7. Пахоруков И.В., Еремченко О.З. Свойства вторично засоленных аллювиальных почв в таежно-лесной зоне Прикамья // Сибирский лесной журнал, 2021. № 3. С. 76-86.

МИКРООРГАНИЗМЫ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ КАНАЛИЗАЦИИ, УСТОЙЧИВЫЕ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Переломов Л.В.¹, Сизова О.И.², Атрощенко Ю.М.¹, Переломова И.В.³

¹Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, Тула, Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия

³Тульский государственный университет, Тула, Россия

Ключевые слова: микроэлементы, бактерии, вторичные отстойники, метантенки, очистка воды

Сточные воды, поступающие на очистные сооружения крупных городов, весьма разнообразны по составу содержащихся в них загрязнений. В сточных водах могут содержаться вещества минерального (песок, глинистые частицы, масла, кислоты, щелочи, соли и т.д.), органического (бытовые отходы, фекалии, растительные масла, жиры, нефтепродукты, волокна растений и т. д) и биологического (вирусы, бактерии, дрожжевые и плесневые грибы, водоросли и т. п.) происхождения в виде растворов и дисперсных систем.

В зависимости от происхождения, вида и качественной характеристики примесей сточные воды подразделяют на три основные категории – бытовые (хозяйственно-фекальные), производственные (промышленные) и дождевые (атмосферные, поверхностные) [1].

Биологическая очистка сточных вод заключается в культивировании смешанных микробных сообществ активного ила, потребляющих компоненты сточных вод в качестве питательных субстратов, тем самым удаляя их из сточной воды. Основным продуктом биоконверсии примесей сточных вод является биологически очищенная вода, побочным – биомасса активного ила. Биологическая очистка сточных вод может осуществляться как в естественных условиях на полях орошения, полях фильтрации и биологических прудах, так и в специальных сооружениях – аэротенках, окситенках, биофильтрах и т.д. [2].

Любое сооружение для биологической деструкции загрязняющих веществ представляет собой искусственную экосистему с определенными характеристиками. Экосистемы очистных сооружений отличаются от природных аналогов культивированием микроорганизмов при высокой концентрации органических веществ и биогенных элементов, высокой плотности микроорганизмов, специфическом кислородном и температурном режиме. Все это обеспечивает высокую интенсивность биохимических процессов на очистных сооружениях и позволяет отнести указанные процессы к биотехнологическим [3].

Очистные сооружения канализации (ОСК) г. Тулы были запроектированы на расчетный срок (1975 г.) мощностью 250 тыс. м³/сутки с возможностью расширения на перспективу (1985 г.) до 450 тыс. м³/сутки. Строительство ОСК началось в 1968 году, I очередь была введена в эксплуатацию в 1976 году, II очередь – в 1977 г. В 2012 году совместно с подрядной организацией была проведена научно-исследовательская работа по созданию перспективной схемы развития водоснабжения и водоотведения г. Тулы до 2025 года. На сегодняшний день очистные сооружения канализации г. Тулы реализуют мощность в 180 тыс. м³/сутки. В их состав входят: приёмная камера с решетками, песколовки, первичные и вторичные отстойники, метантенки, аэротенки, станция механического обезвоживания осадка, иловые карты. Очистные сооружения обслуживает АО «Тулагорводоканал». Нормативы состава сточных вод утверждены Постановлением администрации г. Тулы №1995 от 26.06.2020 г.

В начале октября 2020 г. на очистных сооружениях канализации г. Тулы были отобраны образцы вод и ила на вторичных отстойниках и метантенке для изучения микробиологического и химического состава. Микроэлементный состав растворов, определенный методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой приведен в Таблице 1.

Таблица 1 – Содержание тяжелых металлов в воде и иле очистных сооружений г. Тулы

Элемент	Концентрация, мг/л		
	Вторичный отстойник (вода)	Вторичный отстойник (ил)	Метантенк
Cd	0.0053	0.0037	0.0186
Cu	0.0056	0.0037	0.0248
Ni	0.0089	0.0041	0.1204
Pb	<0.001	0.0038	0.0050
Zn	0.0002	0.00001	0.0002

Посев для определения количества микроорганизмов (КОЕ) проводили путем посева по 100 мкл бактериальной суспензии в чашки Петри на агаризованную среду. Суспензию клеток по поверхности агаризованной среды растирали стерильным стеклянным шпателем. Чашки Петри выдерживали в термостате при 28°C в течение суток. Далее количество микроорганизмов определяли путем прямого подсчета колоний и выражали в количестве бактерий на 1 мл образца. Количество бактерий (КОЕ) составило: ил вторичного отстойника – 2.8×10^6 кл./мл, вода вторичного отстойника – 2.4×10^5 кл./мл, суспензия из метантенка – 1.6×10^5 кл./

Бактерии проверяли на устойчивость к шести тяжелым металлам (ТМ): Co, Ni, Cd, Pb, Cu и Zn. Растворы ТМ готовили из солей: $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{CuCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Тяжелые металлы вносили в среду до конечной концентрации 2, 3, 5 мМоль. Устойчивость к ТМ бактерий оценивали визуально по росту на селективной среде. Далее, выросшие на среде с ТМ бактерии пересевали на селективную среду с соответствующим металлом и культивировали их колонии. Бактерии описывали по фенотипу. Из выделенных бактерий были отобраны несколько штаммов, наиболее устойчивых к разным ТМ и различных по фенотипу.

Из метантенка удалось выделить лишь один штамм, устойчивый к ТМ, а именно к Ni. Из воды и ила отстойников были выделены микроорганизмы, устойчивые к Cd, Cu, Pb, Zn. Среди устойчивых к ТМ штаммов преобладали варианты, устойчивые к Pb и Zn. Из отобранных штаммов выделили геномную ДНК с помощью Quick-DNA Minipter Kit (Zymo Research, USA). Выделенную ДНК использовали для амплификации гена 16S рРНК. ПЦР проводили со следующими праймерами: прямой 27f 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' и обратный 1492r 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'. Амплификацию гена 16S рРНК осуществляли на приборе GeneAmp PCR System 9700 («Applied Biosystems», США) при следующих условиях: первичная денатурация – 95°C, 5 мин; далее 30 циклов: 95°C – 30 с, 55°C – 30 с (температура отжига праймеров), 72°C – 40 с; конечная элонгация – 72°C – 5 мин. Размер ПЦР-продукта 1465 п.н.

Продукты реакции разделяли методом электрофореза в агарозном геле (1.0%) при напряжении 10 В/см. Гель окрашивали раствором бромистого этидия (5 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете с использованием системы гель-документирования Gel DocTM XR («Bio-Rad», США). Таq-ДНК-полимераза, компоненты для ПЦР, концентрированный буфер для электрофореза и маркер «GeneRuler 1kb DNA Ladder» (SM0311) были производства «Fermentas» (Литва). Продукты ПЦР очищали с помощью DNA Clean&Concentrator (Zymo Research, USA), согласно инструкциям фирмы-производителя.

Далее с ПЦР-продуктами проводили сиквенс по Сэнгеру с использованием вышеуказанных праймеров. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 373 3130XL («Applied Biosystems», США). Предварительный филогенетический скрининг сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК осуществляли в базе данных GenBank database, National Centre for Biotechnology Information (NCBI), с помощью пакета программ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Для более точного определения филогенетического положения исследуемого штамма полученную последовательность гена 16S рРНК выравнивали с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью программы CLUSTAL W [4]. В результате была установлена видовая принадлежность выделенных микроорганизмов (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты идентификации устойчивых к ТМ штаммов

Номер	Элемент	Источник выделения	Принадлежность к виду
1	Ni	Метантенк	<i>Serratia proteamaculans</i>
2	Ni	Ил отстойника	<i>Pseudomonas gessardii</i>
3	Cd	Ил отстойника	<i>Pseudomonas fragi</i>
4	Cd	Вода отстойника	<i>Pseudomonas fragi</i>
5	Pb	Ил отстойника	<i>Serratia proteamaculans</i>
6	Pb	Вода отстойника	<i>Pseudomonas fragi</i>
7	Pb	Вода отстойника	<i>Pseudomonas brenneri</i>
8	Zn	Ил отстойника	<i>Pseudomonas gessardii</i>
9	Zn	Вода отстойника	<i>Pseudomonas gessardii</i>
10	Cu	Ил отстойника	<i>Klebsiella pneumonia</i>

Результаты филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК показали, что большинство выделенных устойчивых к ТМ штаммов относятся к роду *Pseudomonas*. Исключение составляют штаммы, устойчивые к Cu, Ni и один из штаммов, устойчивый к Pb.

Таким образом, нами выделены и идентифицированы штаммы микроорганизмов, устойчивых к загрязнению тяжелыми металлами, которые могут быть использованы для осаждения и деструкции органического вещества сточных вод на разных этапах их очистки.

Работа поддержана Грантом Правительства Тульской области в сфере науке и техники 2021 года.

Список цитируемой литературы

1. Яковлев С. В., Карелин Я. А., Жуков А. И., Колобанов С. К. Канализация. Учебник для вузов. Стройиздат. Москва. 1975. 632 с.
2. Алексеев С. К. Контроль качества воды. Инфра-М. Москва. 2004. 154 с.
3. Илялетдинов А. Н., Алиева Р. М. Микробиология и биотехнология очистки промышленных сточных вод. Гылым. Алма-Ата. 1990. 224 с.
4. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing, In: Nucleic acid techniques in bacterial systematic (Stackebrandt E., and Goodfellow M., eds), John Wiley and Sons, New York, 1991, pp. 115–175.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕГАТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ СО СТОРОНЫ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ У ДЕТЕЙ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ МЕДИ И НИКЕЛЯ В КРОВИ

Пескова Е.В.^{1,2}, Землянова М.А.^{1,2}, Булатова Н.И.², Кольдибекова Ю.В.²

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия

Ключевые слова: медь и никель в крови, протеомный профиль плазмы крови, негативные эффекты, нервная система, сердечно-сосудистая система.

В настоящее время особую актуальность сохраняют разработки и исследования на научной платформе «профилактическая среда», направленные на повышение эффективности оценки, прогнозирования и управления рисками здоровью населения для предупреждения развития ряда значимых неинфекционных заболеваний, ассоциированных с воздействием химических факторов окружающей среды. Актуальность данной тематики исследования продекларирована в Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года, в Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (утв. Указом Президента РФ от 01.12.2016 № 642), в Стратегии национальной безопасности Российской Федерации до 2020 года (утв. Указом Президента РФ от 12.05.2009 г. № 537).

В ряде регионов с размещением крупных субъектов хозяйственной деятельности металлургической отрасли промышленности формируются особо высокие уровни загрязнения атмосферного воздуха химическими веществами, к числу которых относятся специфичные для производства соединения никеля и меди. При длительной аэрогенной экспозиции данными металлами, обладающими однонаправленным повреждающим действием на различные органы-мишени, в том числе, нервную и сердечно-сосудистую, у населения формируются негативные эффекты (заболевания) со стороны указанных критических органов и систем [1].

Перспективным направлением для прогнозирования негативных эффектов со стороны систем-мишеней является изучение специфических маркеров изменений гомеостаза не только на клеточном, но и на молекулярном уровне с помощью протеомных технологий. Изучение изменений протеомного профиля плазмы крови позволяет на самых ранних этапах, до возникновения симптомов клеточного и органного поражения, анализировать механизмы возникновения и развития ответных реакций организма на внешнесредовые воздействия [2].

Целью настоящего исследования является выявление прогностически значимых показателей негативных эффектов со стороны сердечно-сосудистой и нервной систем у детей с повышенным содержанием меди и никеля в крови с применением технологии протеомного профилирования.

Объектом исследования являлись образцы плазмы и сыворотки крови 211 детей 4-6 лет с повышенным содержанием меди и никеля в крови (группа наблюдения) и 118 детей аналогичного возраста с содержанием изучаемых химических веществ, соответствующих минимальным или референтным значениям (группа сравнения). Обследование детей выполнено с соблюдением этических принципов Хельсинской декларации и одобрено в установленном порядке Комитетом по биомедицинской этике ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» с обязательным получением информированного добровольного согласия законного представителя.

Химико-аналитическое исследование крови на содержание никеля и меди осуществляли в соответствии с действующими методическими указаниями (МУК 4.1.3230-14). Лабораторное исследование включало анализ изменений уровня биохимических показателей, отражающих негативные эффекты со стороны сердечно-сосудистой (аполипопротеины A1 (Apo A1) и B100 (Apo-B) в сыворотке крови с определением их соотношения, липидограмма плазмы крови) и нервной (глутаминовая и гамма-аминомасляная кислоты (ГАМК), ацетилхолин, нейротропина-3 в сыворотке крови) систем. Исследование изменений белкового состава (протеома) плазмы крови выполнено с помощью технологии двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле с использованием комплекса оборудования PDQuest (Bio-Rad, США), хроматограф UltiMate 3000 (Германия), tandemный масс-спектрометр ABSciex 4000 QTRAP с источником ионизации Nanospray 3 (Канада)). В полученных протеомных картах интенсивность и объем белковых пятен пропорциональны количеству белка в плазме крови.

Оценку полученных значений показателей у детей группы наблюдения выполняли относительно показателей в группе сравнения. Статистический анализ данных выполнен с использованием программы Statistica 10. с применением непараметрического критерия Манна-Уитни. Прогностически значимые показатели негативных эффектов обосновывали на основании полученных достоверных причинно-следственных связей, описываемых многофакторными моделями зависимости «статистически значимое пятно/ изменение уровня биохимического показателя – концентрация никеля и меди в крови». Достоверность и адекватность полученных моделей оценивали на основе дисперсионного анализа с использованием F-критерия Фишера, коэффициента детерминации (R^2), t-критерию Стьюдента при статистической значимости $p \leq 0,05$.

В крови детей группы наблюдения содержание никеля и меди превышало до 3,5 раза значения показателей в группе сравнения ($p=0,0001-0,001$). Исследование биохимических показателей, характеризующих риск раннего развития сосудистых нарушений, у детей группы наблюдения относительно группы сравнения свидетельствует о повышенных значениях Apo-B, общего холестерина и липопротеина низкой плотности в сыворотке крови ($p=0,0001-0,024$). В результате построения многофакторных моделей установлена достоверная причинно-следственная связь между повышенным уровнем Apo-B в сыворотке крови и повышенным содержанием в крови никеля и меди ($R^2=0,79$; $b_0=-3,87$; $b_1=83,16$; $b_2=2,45$; $p=0,0001$).

Результаты оценки баланса нейромедиаторов в сыворотке крови детей группы наблюдения относительно показателей в группе сравнения показали снижение до 1,4 раза содержания глутаминовой кислоты и ацетилхолина (медиаторов возбуждения) ($p=0,0001-$

0,029), снижение до 1,3 раза – ГАМК (медиатора торможения) в сыворотке крови ($p=0,001$). Обращает на себя внимание понижение в 1,8 раза уровня нейротропина-3 в сыворотке крови относительно показателя в группе сравнения, что свидетельствует о нарушении восстановления поврежденных нейрональных структур ($p=0,008$). В результате построения многофакторных моделей установлена достоверная причинно-следственная связь между пониженным уровнем нейротропина-3 в сыворотке крови и повышенным содержанием в крови никеля и меди ($R^2=0,80$; $b_0=1,05$; $b_1=-99,49$; $b_2=-66,30$; $p=0,0001$).

Сравнительный анализ результатов денситометрического измерения протеомных карт плазмы крови обследуемых детей позволил выявить наличие достоверных различий относительного объема порядка 20-ти белковых пятен у детей группы наблюдения относительно группы сравнения. Анализ биологической функции выявленных белков плазмы крови позволил выделить белки аполипопротеин А-I и витронектин (с вероятностью идентификации пептида от 95,9 до 99,9 %), якорный белок А-киназы 9 и транстиретин (с вероятностью идентификации пептида от 52,3 до 99,0 %), характеризующие развитие ряда негативных эффектов со стороны сердечно-сосудистой и нервной системы. У детей группы наблюдения относительно детей группы сравнения установлено увеличение в 8,0-12,3 раза белков аполипопротеина А-I, А-киназы 9, витронектина ($p=0,0001-0,001$) и, напротив, снижение в 5,4 раза белка с последовательностью транстиретина ($p=0,0001$). Установлены прямые причинно-следственные связи между повышенным содержанием в крови меди, никеля и увеличением относительного объема белковых пятен, включающих последовательность аполипопротеина А-I и А-киназы 9 ($R^2=0,30$; $b_0=-656,8$; $b_1=1801,1$; $b_2=63518,1$; $p=0,008$), витронектина ($R^2=0,44$; $b_0=-1372,00$; $b_1=2743,3$; $b_2=112937,00$; $p=0,0001$); обратная зависимость уменьшения объема и интенсивности белкового пятна, включающего транстиретин от повышенного уровня в крови меди и никеля ($R^2=0,35$; $b_0=4870,1$; $b_1=-3266,9$; $b_2=-79946,5$; $p=0,003$).

Установленные изменения уровня Аро-В в сыворотке крови, белков плазмы крови аполипопротеина А-I и витронектина могут свидетельствовать о развитии негативных эффектов со стороны сосудистого русла, возникновению атеросклеротических изменений в эндотелии, что в дальнейшем может способствовать развитию артериальной гипертензии и кардиомиопатии [3-4]. Дисбаланс нейромедиаторов (глутаминовой кислоты, ацетилхолина, гамма-аминомасляной кислоты в сыворотке крови), изменение уровня нейротропина-3 в сыворотке крови, белков плазмы крови А-киназы 9 и транстиретина свидетельствуют о развитии негативных эффектов в виде нарушения синаптической передачи нервных импульсов, трофики и пластичности нейронов [5-6]. Данные предположения подтверждает повышенная частота встречаемости болезней системы кровообращения в виде кардиомиопатии неуточненной (МКБ-10: R01.0) до 1,5 раза и функциональных расстройств центральной и вегетативной нервной систем (МКБ-10: G90.9, G90.8) до 5,8 раза у детей группы наблюдения относительно сравниваемой группы ($p=0,0001$).

Таким образом, у детей с повышенным содержанием в крови меди и никеля установлено ассоциированное увеличение уровня Аро-В, объема белковых пятен плазмы крови аполипопротеина А-I, витронектина, А-киназы 9 и понижение уровня нейротропина-3 в сыворотке крови, транстиретина в плазме крови, что является прогностически неблагоприятным для развития ранних сосудистых нарушений, адекватной передачи нервного импульса между синапсами и структурно-функциональных механизмов нейропластичности. Выявленные биохимические показатели и протеомные маркеры необходимо учитывать при разработке профилактических мероприятий, направленных на устранение негативных последствий, ассоциированных с аэрогенным воздействием металлов.

Список цитируемой литературы

1. Клюев Н.Н., Яковенко Л.М. «Грязные» города России: факторы, определяющие загрязнение атмосферного воздуха // Вестник Российского университета дружбы народов.

Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2018. – Т. 26. – № 2. – С. 237–250. DOI 10.22363/2313-2310-2018-26-2-237-250

2. Шендеров Б.А. «Омик»-технологии и их значение в современной профилактической и восстановительной медицине // Вестник восстановительной медицины. – 2012. – № 3. – С. 70–78.
3. Wu S., Deng F., Wei H., Huang J., Wang H., Shima M. et al. Chemical constituents of ambient particulate air pollution and biomarkers of inflammation, coagulation and homocysteine in healthy adults: a prospective panel study. Part. Fibre Toxicol. – 2012. – № 9 (49). – P.1-13. DOI:10.1186/1743-8977-9-49.
4. Ярославская Е.И., Аксенова К.В. Коронарный атеросклероз и нарушения ритма сердца / Е.И. Ярославская, К.В. Аксенова // Сибирский медицинский журнал. – 2019. – № 34(2). – С. 21–25.
5. Бонь Е.И. Характеристика медиаторов и модуляторов, их биологическая роль в функционировании нервной системы // Вестник НовГУ. Сер.: Медицинские науки. 2021. – №1(122). – С.6-14. DOI: [https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1\(122\).6-14](https://doi.org/10.34680/2076-8052.2021.1(122).6-14).
6. Крыжановская С.Ю., Запара М.А., Глазачев О.С. Нейротрофины и адаптация к средовым стимулам: возможности расширения «терапевтического потенциала» (Краткий обзор) // Вестник международной академии наук (русская секция). – 2020. – 1. – С. 36-43.

УТИЛИЗАЦИЯ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ КУЛЬТУРОЙ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Пирожкова И.С., Пермякова И.А.

Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: глицерин, утилизация отходов, культура дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Глицерин является ценным веществом, которое используется в медицинской, фармацевтической, пищевой, лакокрасочной, текстильной и военной отраслях. Лидерами по производству глицерина на мировом рынке являются Европейский Союз, Соединенные Штаты и Юго-Восточная Азия. В настоящее время глицерин производится в больших масштабах, полностью удовлетворяющих рыночный спрос на него. Помимо этого, глицерин образуется в качестве побочного продукта при процессах производства алкогольных напитков и эфиров жирных кислот, применяющихся в качестве биодизельного топлива, моторных масел и детергентов. Уровень отходов данных производств достаточно велик. Например, на каждые 10 кг образующегося биодизельного топлива приходится 1 кг глицерина [1].

Глицеринсодержащие отходы содержат большое количество трудноудаляемых примесей, таких как вода, соли органических и неорганических кислот, жирные кислоты, щелочи, поэтому традиционные методы очистки в данном случае малоэффективны. Использование ионообменного процесса для удаления примесей затруднено по той причине, что при высокой концентрации солей ионообменные смолы засоряются с высокой скоростью и на их регенерацию необходимы большие денежные затраты. Теоретически возможный процесс дистилляции требует больших энергетических затрат в связи с высокой удельной теплоемкостью глицерина, составляющей 2430 Дж/(кг*К).

Многие технологии использования глицеринсодержащих отходов имеют недостатки вследствие недостаточной разработки и не используются в условиях производства. Например, к таким технологиям относится возможность использования глицеринсодержащих отходов при размоле твердых веществ, где глицерин может выступать как интенсификатор размолла. Также глицерин и его производные могут использоваться при приготовлении маслянистых и октаноповышающих добавок для горючего[2].

В настоящее время активно рассматриваются различные способы химической и биологической конверсии глицеринсодержащих отходов, позволяющие получать ценные продукты без трудоемкой очистки «сырого» глицерина.

Особенно перспективным направлением является разработка технологий утилизации глицеринсодержащих отходов с помощью микроорганизмов. К их преимуществам относятся низкая энергозатратность, возможность использования сырья без предварительной очистки и экологичность. Ценность могут представлять, как метаболиты, синтезируемые микроорганизмами, так и непосредственно биомасса, которая может использоваться в качестве кормового белка для крупного рогатого скота.

Одним из видов микроорганизмов, использующим глицерин в качестве источника питания, являются дрожжи *Yarrowia lipolytica*. Данные дрожжи относятся к аскомицетовым дрожжевым грибам, в природе встречаются на жиросодержащих и морских субстратах. Известна практика выращивания дрожжей *Yarrowia lipolytica* в качестве белково-витаминного продукта, что подтверждает безопасность использования данного продуцента.

Данные дрожжи обладают способностью расти на различных органических субстратах, включающих глюкозу, н-алканы и этанол. Также существуют литературные данные о возможности утилизации глицерина в жидких питательных средах. Для того, чтобы выяснить полноту утилизации глицерина культурой дрожжей *Yarrowia lipolytica* был проведен следующий эксперимент.

В колбу на 250 мл добавили 100 мл среды Ридер следующего состава(г/л): минеральные соли – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,4; NaCl – 0,5; KH_2PO_4 – 0,1; K_2HPO_4 – 1,0; микроэлементы (мг/л): KJ – 0,1; B – 0,01; Mn^{2+} – 0,01; Zn^{2+} – 0,03; Cu^{2+} – 0,01; Mo^{6+} – 0,01; Fe^{2+} – 0,05 (Burkholder, 1944)[3]. В качестве источника углерода был внесен глицерин, начальная концентрация которого равнялась 1,5% мас. Далее в стерильных условиях был внесен инокулят культуры дрожжей в объеме 100 мкл. Культивирование осуществляли в течение 7 суток при температуре воздуха 32°C при постоянном перемешивании (150 об/мин). На 7 сутки наблюдалось помутнение среды и обильное пенообразование, что указывает на активный рост культуры. По истечению времени культивирования биомасса дрожжей была отделена от культуральной жидкости путем центрифугирования. Концентрация глицерина в среде в конце культивирования оказалась равна 0,033% мас., что указывает на способность дрожжей *Yarrowia lipolytica* использовать данный субстрат в качестве единственного источника углерода.

Доказанная возможность утилизации глицерина культурой дрожжей *Yarrowia lipolytica* позволяет повести оптимизацию ряда производственных процессов и эффективно перерабатывать глицеринсодержащие отходы.

Список цитируемой литературы

1. Biodiesel's trash is a biorefineries' treasure: the use of "dirty" glycerol as an industrial fermentation substrate / Crosse A.J., Brady D., Zhou N., Rumbold K. // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 2019. – №36 (1). – P. 1-5.
2. Патент № 2 471 768(13) С2 Российская Федерация МПК C07C 67/03(2006.01) C07C 69/30(2006.01) C08K 5/103(2006.01) Способ утилизации глицеринсодержащего побочного продукта производства биодизельного топлива /Сафронов С.П., Красных Е. Л., Леванова С.В.Соколов А. Б., Жабина А. А.; заявитель и патентообладатель ООО "Дескриптор" – Заявл.2011.04.07; Оpubл. 2013.01.10.
3. Ассимиляция триглицеридов и продуктов их гидролиза у дрожжей *Yarrowia lipolytica* / Камзолова С.В., Моргунов И.Г., Козырева Т.Н., Финогонова Т.В. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2007. Т. 3. №2 – с. 5-12.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ ПЕРЕМЕННОЙ ВАЛЕНТНОСТИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РОДОКОККОВ

Писцова О.Н.¹, Куюкина М.С.^{1,2}, Ившина И.Б.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: *Rhodococcus*, наночастицы, металлы переменной валентности, жизнеспособность, концентрационная зависимость

На современном этапе уделяется большое внимание биологическому разнообразию как обязательному условию устойчивого развития, а также рассматриваются факторы изменения человеком окружающей среды. При этом особый интерес представляет понимание воздействия изменяющейся антропогенной среды на разнообразие микроорганизмов – обитателей биотопов техногенно поврежденных экосистем. В частности, актуален анализ степени воздействия наночастиц металлов и их оксидов, имеющих многотоннажный выпуск в окружающую среду через промышленное производство, на актинобактерии рода *Rhodococcus*, являющиеся значимым компонентом природных биоценозов и обладающие перспективными характеристиками для биотехнологии и защиты окружающей среды [1-4].

Цель работы – исследование влияния наночастиц металлов переменной валентности и их оксидов на жизнеспособность коллекционных культур, принадлежащих к различным видам родококков. В работе использовали 24 штамма, относящихся к видам *Rhodococcus ruber*, *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. erythropolis*, *R. fascians*, из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM # 768; www.iegml.ru/iegmlcol). В качестве металлических наночастиц (НЧ) использовали НЧ Co, CuO и ZnO, хранящиеся в растворе β-циклодекстрина. Жизнеспособность бактерий определяли методом окрашивания йодонитротетразолия хлоридом (Sigma-Aldrich, США). Выращенные в МПБ и дважды отмытые натрий-фосфатным буфером клетки ресуспендировали в 50 мкл среды RS следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 2,0, K_2HPO_4 – 2,0, KNO_3 – 1,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0, NaCl – 1,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, $\text{FeCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 до достижения ОП₆₀₀ = 0,5, смешивали с 50 мкл суспензии НЧ в β-циклодекстрине и инкубировали при 28°C на микропланшетном шейкере-инкубаторе Titramax 1000 (Heidolf-Instruments, Германия) в течение 24 ч. Образовавшийся формазан, имеющий красно-фиолетовый цвет, экстрагировали этилацетатом из суспензии бактерии/наночастицы и определяли ОП₆₂₀ окрашенной суспензии на микропланшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation, Финляндия) с программным обеспечением Ascent Software v.2.6 (Thermo Labsystems, Финляндия). В качестве биотического контроля использовали суспензию клеток с соответствующим разведением средой RS, в качестве абиотического контроля – суспензию НЧ, контрольные образцы готовили аналогично опытным вариантам.

По нашим данным (рис. 1), среди исследованных культур наиболее устойчивыми к воздействию металлических НЧ были представители *R. fascians*, а наиболее чувствительными – *R. erythropolis*. При этом жизнеспособность клеток *R. fascians* превышала контрольные показатели на 10-40% и возрастала при увеличении концентрации НЧ Co и ZnO, но незначительно снижалась (на 5-10%) под действием НЧ CuO, что можно объяснить антибактериальным действием оксида меди. В целом, исследованные виды родококков располагались в порядке снижения устойчивости к нанометаллам в следующем ряду: *R. fascians* > *R. rhodochrous* > *R. opacus* > *R. ruber* > *R. erythropolis*. Однако нами не выявлено четкой видовой зависимости степени устойчивости родококков к воздействию конкретного нанометалла, что, по-видимому, определяется штаммовой специфичностью исследуемых коллекционных культур.

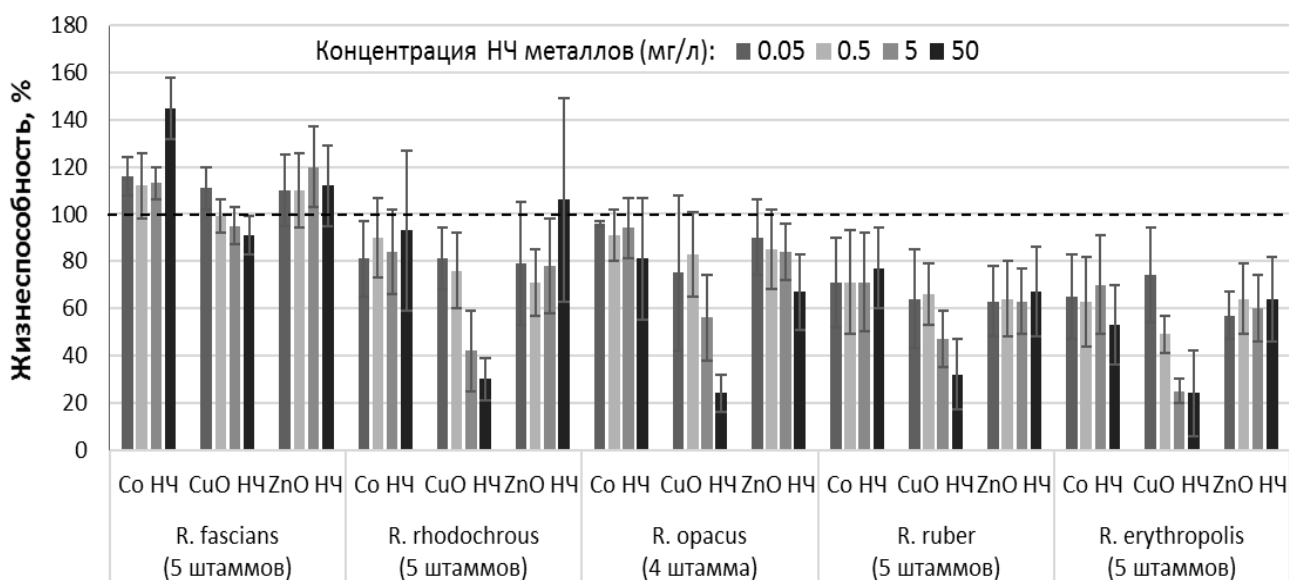


Рисунок 1 – Влияние НЧ металлов на жизнеспособность *Rhodococcus* spp.
Приведены средние для вида показатели жизнеспособности клеток

Как следовало ожидать, наиболее токсичными в отношении родококков были НЧ оксида меди (рис. 2), вызывающие 20-40%-ое подавление жизнеспособности клеток (за исключением *R. fascians*) даже при минимальной (0,05 мг/л) тестируемой концентрации, а также 60-80%-ое ингибирование бактериальных культур при максимальной (50 мг/л) концентрации нанометалла. Наночастицы оксида цинка оказывали менее выраженный ингибирующий эффект на коллекционные культуры родококков во всем диапазоне концентраций (0,05-50,0 мг/л), приводя к снижению числа живых клеток на 20-40%. Наименее токсичными для родококков оказались НЧ кобальта, вызывающие лишь 5-20%-ое подавление жизнеспособности родококков, а, в случае *R. fascians* и *R. rhodochrous*, повышение данного показателя. Стимулирующий эффект НЧ Co и Zn при высокой (50 мг/л) концентрации может быть связан со стрессорной реакцией бактериальных клеток на воздействие субингибиторной концентрации наночастиц. В литературе имеются противоречивые данные по влиянию НЧ металлов переменной валентности на различные группы микроорганизмов – от стимулирования роста, подвижности и хемотаксиса до сильного антибактериального эффекта, однако механизмы разнонаправленных реакций микроорганизмов на воздействие нанометаллов до конца не выяснены [5, 6].

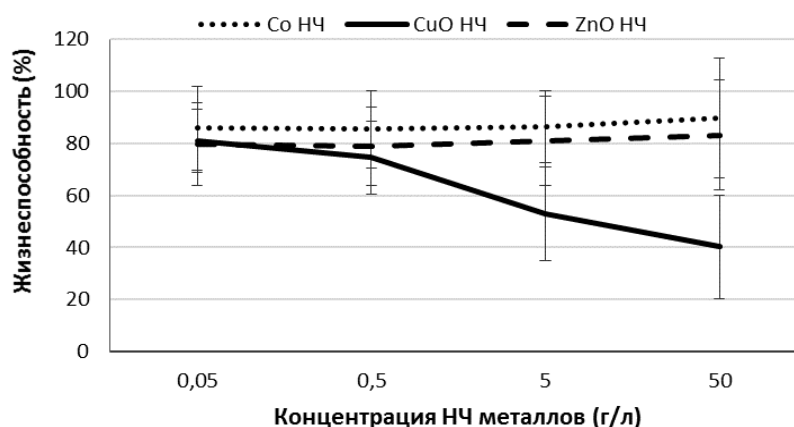


Рисунок 2 – Динамика жизнеспособности родококков в присутствии НЧ металлов

Исследования выполнены в рамках госзаданий (AAAA-A19-119112290008-4, AAAA-A20-120081990069-3) и поддержаны грантами РФФИ (18-29-05006 и 20-44-596001)

Список цитируемой литературы

1. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костина Л.В. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов // Экология. 2013. № 2., С 115-123.
2. Колесников С.И., Вардин В.М., Тимошенко А.И., Денисова Т.В., Кузеев К.Ш., Акименко Ю.В. Оценка экотоксичности наночастиц оксидов кобальта, меди, никеля, и цинка по биологическим показателям состояния чернозёма обыкновенного // Юг России: экология, развитие. 2020. Т. 15, № 1. С 130 – 136.
3. Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Sunampalli R.Y. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – evidence and impacts // Waste Management. 2010. V. 30. P. 504 – 520.
4. Carvalho C.C.C.R. de, Fonseca M.M.R. da. The remarkable *Rhodococcus erythropolis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. T. 67. С 715 – 726.
5. Sibi G., Ananda Kumar D., Gopal T., Harinath K., Banupriya S., Chaitra S. Metal nanoparticle triggered growth and lipid production in *Chlorella vulgaris*. Int. J. Sci. Res. Environ. Sci. Toxicol. 2017. V. 2. N. 1. P. 1-8.
6. He X., Aker W.G., Fu P.P., Hwang H.-M. Toxicity of engineered metal oxide nanomaterials mediated by nano–bio–eco interactions: a review and perspective // Environ. Sci. Nano. 2015. V. 2. N. 6. P. 564–582.

СТРУКТУРА И ДИНАМИКА СООБЩЕСТВ АНТОФИЛЬНЫХ НАСЕКОМЫХ НЕКОТОРЫХ ЗОНТИЧНЫХ (АРИАСЕАЕ) ТРОИЦКОГО ЗАКАЗНИКА

Питкин Д.Н., Лямин М.Я.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: антофилия, опылители, насекомые, зонтичные

Приспособление насекомых к питанию на цветах и их опылению называют антофилией, а встречные приспособления растений – энтомофилией [4]. На территории Троицкого заказника изучена структура посетителей соцветий *Heracleum sibiricum* L. и *Seseli libanotis* (L.) Koch (Ариасеае). Всего было поймано 3250 видов. На основании полученных данных был проведен анализ сходства антофильных комплексов.

Антофильные насекомые – специализированная группа членистоногих, трофически связанная с цветками многих высших растений. Видовое разнообразие насекомых обуславливает то, что несколько видов антофилов могут конкурировать за питание на одном виде растений. Сумма видов, опыляющих конкретный вид растений, формируют антофильные комплексы. Коэволюция сопровождается формированием комплекса взаимных адаптаций (коадаптаций), оптимизирующих устойчивые взаимодействия популяций разных видов [5].

Сбор материала производился в ООПТ «Троицкий государственный природный комплексный заказник» летом 2019 года Сбор насекомых производился по методике В.В. Попова [2] малым энтомологическим сачком. Насекомые отлавливались в течение всего периода цветения в тычиночную и рыльцевую стадии. Отлов производился в течение часа в лучшее время для лета насекомых

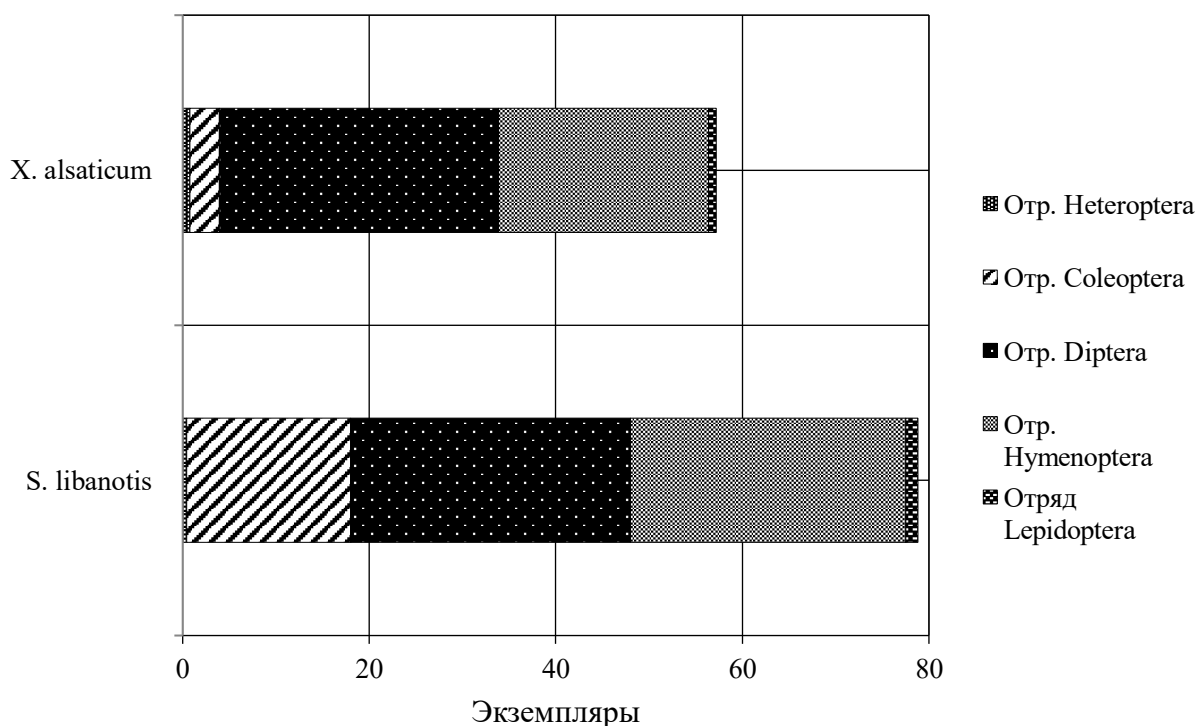
Среди множества видов зонтичных, в качестве модельных были выбраны златогоричник эльзаский (*Xanthoselinium alsaticum* L.) и Жабрица порезниковая (*Seseli libanotis* (L.) Koch, 1824), как одни из массово представленных на территории заказника и на прилегающей к нему территории. Открытое положение нектара на надпестичном диске, неспециализированность цветка способствуют посещению его разнообразными группами насекомых [1].

В ходе исследования было проведено 47 часов учетов на соцветиях зонтичных и в процессе камеральной обработки было определено 56 видов из 36 семейств и 5 отрядов. Всего на жабрице было отловлено 2049 насекомых за 26 часов учетов, из них определено 53 вида. На златогоричнике за 21 час наблюдений пойман 1201 экземпляр, относящийся к 33 видам. Всего общих видов 27. Для описания структуры антофильных комплексов нами подсчитана сумма пойманных экземпляров по семействам в отрядах (табл.).

Распределение количества экземпляров пойманных опылителей зонтичных, в скобках – удельная (на 1 учет) попадаемость. N – часов-учетов

Виды растений	<i>S. libanotis</i> (n = 26)	<i>X. alsaticum</i> (n = 21)
Отряды насекомых		
Heteroptera	11 (0,42)	16 (0,76)
Coleoptera	458 (17,6)	67 (3,2)
Diptera	779 (30,0)	627 (29,9)
Hymenoptera	768 (29,5)	473 (22,5)
Lepidoptera	33 (1,3)	18 (0,86)

Для сравнения таксономической структуры комплексов антофилов была построена диаграмма, отражающая встречаемость представителей отрядов для каждого изученного нами растения (рис.).



Соотношение попадаемости представителей различных отрядов для каждого зонтичного в пересчете на час

Исходя из полученных нами данных можно сделать вывод, что антофильные комплексы Жабрицы порезниковой и Златогоричника характеризуются как неспецифические миофильно-меллитофильные: среди опылителей преобладают двукрылые (Diptera) и перепочатокрылые (Hymenoptera). Наименьшим таксономическим богатством отличаются клопы (Heteroptera) и

бабочки (Lepidoptera). Также отмечается относительно низкое разнообразие жесткокрылых (Coleoptera) к златогоричнику. Из этого можно сделать вывод, что антофильные консорции зонтичных, являются неспециализированными и наполняются за счет местной фауны. Это подтверждает выводы Е. Н. Устиновой с соавт. [3] о высоком конкурентном преимуществе зонтичных при вселении в нарушенные местообитания за счет неизбирательного привлечения опылителей.

Список цитируемой литературы

1. Гринфельд Э.К. Происхождение антофилии у насекомых// Л.: Изд-во ЛГУ, 1962. 186 с.
2. Попов В.В. Сбор и изучение опылителей сельскохозяйственных культур и других растений: в помощь работникам на ползащитных лесных полосах // М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950. Т. 2. 36 с.
3. Устинова Е.Н., Савина К.А., Лысенков С.Н. Новые данные о консортивных связях борщевика сосновского с антофильными насекомыми // Российский Журнал Биологических Инвазий, 2017 №3– С. 98-112.
4. Чернышев В.Б. Экология насекомых // Учебник. – М.: Изд-во МГУ, 1996 – 304 с.
5. Шилов И.А. Экология // М.: Высшая школа, 1997. – 512 с.

ЗНАЧЕНИЕ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА В УСТОЙЧИВОСТИ К БИОИНСЕКТИЦИДАМ

Поленогова О.В., Ярославцева О.Н., Кривопапов А.В., Носков Ю.А., Клементьева Т.Н.,
Ходырев В.П., Крюкова Н.А., Крюков В.Ю., Глупов В.В.

Институт Систематики и Экологии Животных СО РАН, Новосибирск, Россия

Ключевые слова: *Leptinotarsa decemlineata*, биоинсектициды, энтомопатогены, симбионты, микробиота

Бактериальное сообщество насекомых может играть важную роль в их восприимчивости к инфекциям и инсектицидам [1]. Влияние бактериальных ассоциатов колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) на развитие его инфекций, вызываемых патогенами, и токсикозов, вызываемых инсектицидами практически не изучено. Мы анализировали сообщество бактерий кишечника колорадского жука на основе секвенирования региона 16S rRNA и показали, что доминантами кишечника являются спироплазмы и энтеробактерии, причем для последних характерно высокое видовое разнообразие. Далее мы оценили влияние культивируемых энтеробактерий на восприимчивость *L. decemlineata* к биоинсектицидам на основе энтомопатогенных грибов, бактерий *Bacillus thuringiensis* и метаболитов актинобактерий – авермектинов. Насекомые, предварительно обработанные антибиотиками, были менее восприимчивы к энтомопатогенным грибам, бактериям *Bacillus thuringiensis* и авермектинам. Однако ре-интродукция энтеробактерий в кишечник, повышала восприимчивость личинок к *Bacillus thuringiensis* и авермектинам. Гистологические изменения ткани кишечника, активность пищеварительных ферментов, и бактериальное сообщество личинок были проанализированы при совместном действии патогенов и инсектицидов. Полученные результаты, взятые вместе, свидетельствуют о том, что энтеробактерии могут ускорять развитие патогенезов и токсикозов у *L. decemlineata*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 20-74-10043 и № 19-76-00032

© Поленогова О.В., Ярославцева О.Н., Кривопапов А.В., Носков Ю.А., Клементьева Т.Н.,
Ходырев В.П., Крюкова Н.А., Крюков В.Ю., Глупов В.В., 2021

Список цитируемой литературы

1. Shao, Y., Chen, B., Sun, C., Ishida, K., Hertweck, C., Boland, W. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota // Cell Chem. Biol. – 2017. – №.24, – P.66–75. Doi: 10.1016/j.chembiol.2016.11.015.

БИОДЕГРАДАЦИЯ КЕТОПРОФЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РОДОКОККОВ

Полыгалов М.А.^{1,2}, Тюмина Е.А.^{1,2}, Ившина И.Б.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

Ключевые слова: *Rhodococcus*, биодеструкция, кетопрофен

В настоящее время остро обозначилась проблема загрязнения окружающей среды фармацевтическими загрязнителями [1]. Одним из наиболее распространенных фармполлютантов является кетопрофен (син. Кетонал®, Фастум®) – популярный препарат группы нестероидных противовоспалительных средств с высоким показателем тотального потребления в практической медицине и ветеринарии [2–4]. Данный препарат повсеместно обнаруживается в открытых экосистемах. Традиционные физико-химические способы его нейтрализации недостаточно эффективны и нередко приводят к образованию еще более опасных и токсичных побочных продуктов [5].

Представители класса *Actinomycetia* – одна из экологически значимых групп микроорганизмов, характеризующаяся исключительной метаболической пластичностью и наличием активных оксигеназных ферментных комплексов для биодеградаций сложных гидрофобных органических соединений [6].

Цель настоящей работы – оценка способности штаммов актиномицетов из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, реестровый номер Уникальной научной установки 73559, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, www.iegmc.ru) к биологической деградации кетопрофена. В работе использовали 190 коллекционных штаммов, принадлежащих к родам *Gordonia*, *Dietzia* и *Rhodococcus*. Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) кетопрофена в отношении исследованных бактериальных культур проводили стандартным методом серийных разведений. В экспериментах по биодеструкции кетопрофена использовали минерально-солевую среду RS [7], в которую кетопрофен вносили в концентрации 0,01%. Культивирование бактерий проводили в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об. %).

Содержание фармвещества в среде культивирования актинобактерий контролировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью хроматографа LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония), оборудованного хроматографической колонкой с обращенно-фазным сорбентом Discovery® C18, 25 cm × 4.6 mm, and 5µm (Supelco, США) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A). Влияние кетопрофена на морфологию и микрорельеф поверхности живых бактериальных клеток исследовали на базе *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета с использованием системы комбинированного атомно-силового и конфокального лазерного сканирования, включающей атомно-силовой микроскоп (АСМ) MFP-3D-BIO™ (Asylum Research Inc., США) и конфокальный лазерный микроскоп (КЛСМ) Olympus Fluo View 1000 (Olympus Corporation, Япония).

По нашим данным, все использованные в работе коллекционные штаммы сохраняли жизнеспособность в присутствии кетопрофена в диапазоне концентраций от 6250 до 25000 мг/л (таблица 1).

Таблица 1 – Минимальная подавляющая концентрация кетопрофена в отношении актиномицетов разных видов

Вид	МПК, мг/л
<i>G. alkanivorans</i> , <i>G. amarae</i> , <i>G. amicalis</i> , <i>G. rubripertincta</i> , <i>R. aetherivoran</i> , <i>R. erythropolis</i> , <i>R. imtechensis</i> , <i>R. pyridinivorans</i> , <i>R. qingshengii</i> , <i>R. rhodochrous</i> , <i>R. ruber</i>	12500–≥25000
<i>D. maris</i> , <i>R. fascians</i> , <i>R. globerulus</i> , <i>R. koreensis</i> , <i>R. maanshanensis</i>	12500
<i>R. cerastii</i> , <i>R. cercidiphylli</i>	6250–≥12500
<i>R. jostii</i> , <i>R. wratislaviensis</i> , <i>R. yunnanensis</i>	6250
<i>R. corynebacterioides</i>	3125–≥6250
<i>R. percolatus</i> , <i>R. zopfii</i>	3125

Представители *R. erythropolis* и *R. ruber* характеризовались более выраженной резистентностью по отношению к фармполлютанту (МПК 12500–2500 мг/л). В сравнительных экспериментах максимальную (38,06 %) биодеструкцию кетопрофена на 14 сут регистрировали в случае использования клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 746.

По данным АСМ и КЛСМ, присутствие кетопрофена в среде культивирования индуцировало морфологические изменения клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 746, в частности достоверное значительное уменьшение их средних размеров – длины и ширины в 2,3 и 1,3 раза соответственно, а также выраженное увеличение соотношения площади поверхности клетки к её объёму (S/V) в 1,43 раза (таблица 2).

Таблица 2 – Морфометрические параметры клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 746 в присутствии *n*-гексадекана (контроль) или *n*-гексадекана и кетопрофена

Вариант	Длина, мкм	Ширина, мкм	Площадь, S, мкм ²	Объём, V, мкм ³	S/V, мкм ⁻¹
Контроль	2,8±0,35	1,15±0,25	16,71±0,67	4,19±0,035	3,99±0,17
Кетопрофен (0,01%)	1,2±0,15	0,9±0,2	6,78±0,2	1,19±0,006	5,7±0,2

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-14-00132, <https://rscf.ru/project/21-14-00132>.

Список цитируемой литературы

1. Chinnaiyan P., Thampi S.G., Kumar M., Mini K.M. Pharmaceutical products as emerging contaminant in water: relevance for developing nations and identification of critical compounds for Indian environment // Environ. Monit. Assess. – 2018. – V.190. – Article 288.
2. Sim W.J., Lee L.W., Oh J.E. Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea // Environ. Pollut. – 2010. – V. 158, N. 5. – P. 1938–1947.

3. Тюмина Е.А., Бажутин Г.А., Картагена Гомез А.д.П., Ившина И.Б. Нестероидные противовоспалительные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей // Микробиология. – 2020. – Т.89, № 2. – С.152–168.
4. Wang J., Zhao S., Zhang M., He B. Targeted eco-pharmacovigilance for ketoprofen in the environment: Need, strategy and challenge // Chemosphere. – 2018. – V. 194. – P. 450–462.
5. Marchlewicz A., Guzik U., Hupert-Kocurek K., Nowak A., Wilczyńska S., Wojcieszynska D. Toxicity and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. – 2017. – V. 24, N. 8 – P. 7572–7584.
6. Ivshina I.B. Current situation and challenges of specialized microbial resource centres in Russia // Microbiology. – 2012. – V. 81, N. 5 – P. 551–560.
7. Catalogue of Strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms [Электронный ресурс]. URL: <http://www.iegmc.org/strains/index.html> (дата обращения 29.09.2021).

ОСОБЕННОСТИ БИОДЕСТРУКЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ЯПОНСКОГО МОРЯ

Пономарева А.Л., Еськова А.И., Полоник Н.С., Шакиров Р.Б., Обжиров А.И.

Тихоокеанский Океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН,
Владивосток, Россия

Ключевые слова: биодеструкция углеводородов, морские донные отложения

Естественные нефте- и газопроявления в морях – это сложное геологическое явление, которое оказывает ведущее средообразующее действие на формирование микробиомов донных отложений. Большое количество работ посвящено изучению аэробного окисления углеводородов микроорганизмами, выделенными из газовых и нефтяных месторождений морей.

Анализ гена 16S рРНК показал, что наиболее часто выделяют бактерий, относящихся к типу Proteobacteria и Firmicutes [1, 2]. Биodeградация углеводородов в отсутствие кислорода на больших глубинах и в восстановленном слое донных отложений обеспечивается сульфатредуцирующими бактериями [3]. В нефтяных месторождениях Северного моря и Атлантического океана сульфатредуцирующие и нефтеокисляющие бактерии были обнаружены совместно [4, 5].

Северная часть Японского моря представляет особый интерес для исследования из-за своего геологического строения и как район обнаружения газогидратов в пределах юго-западного склона о. Сахалин. В шельфовых районах Японского моря газогидраты не установлены, но отмечаются аномально высокие концентрации метана в газосодержащих слоях [6]. Изучение особенностей биodeградации углеводородов бактериями в аэробных и анаэробных условиях важно для понимания микробных процессов, протекающих морских донных отложениях.

Район исследований расположен в северной части Японского моря и включает в себя 2 полигона. Северный – прилегающий к Татарскому проливу, характеризуется наличием газогидратов в пределах юго-западного склона о. Сахалин; Южный – расположен ближе к Центральной котловине Японского моря (см. рис. 1).

В работе использовали верхнюю часть восстановленного слоя донных отложений северной части Японского моря, отобранную на глубине 0-30 см. от поверхности дна с 22 станций в ходе двух рейсов: ОР-54 НИС «Академик А.И. Опарин», LV81 НИС «Академик А.М. Лаврентьев».

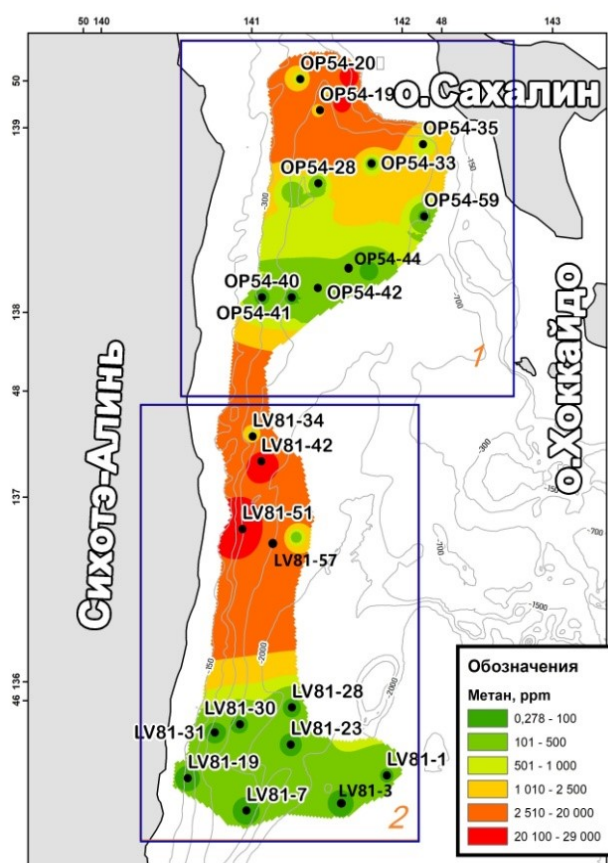
Для создания накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов использовали морскую минеральную среду (Marine salt medium) с содержанием соли 35‰.

В качестве единственного источника углерода использовали стерильную сырую нефть. Чистые культуры выделяли методом истощающего штриха. Для создания анаэробных условий использовали анаэроостаты с азотной атмосферой.

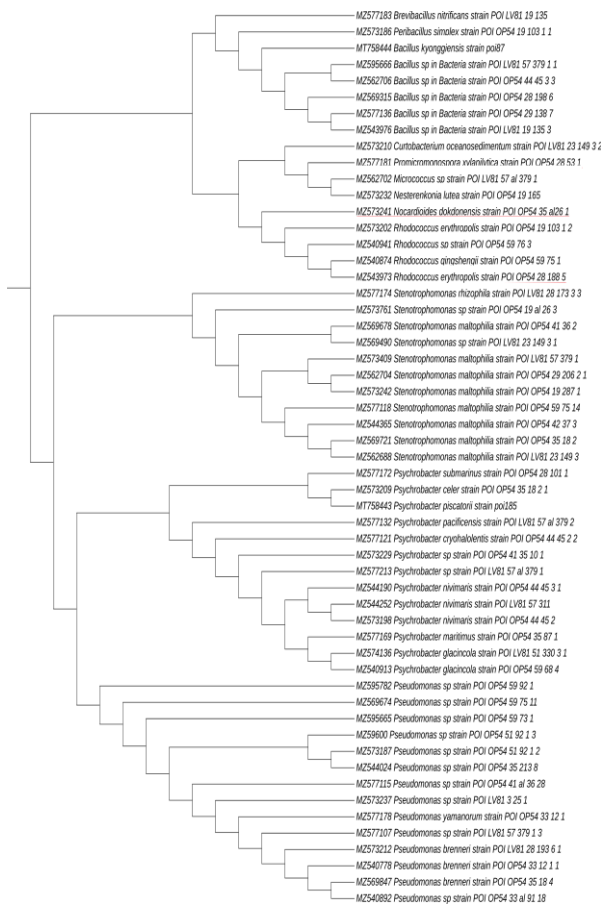
Секвенирование ДНК нефтеокисляющих штаммов проводилось в компании ООО «Синтол», г. Москва по методу Сэнгера с использованием набора BigDye v3.1. на генетическом анализаторе ABI 3130xl (ThermoFisher Scientific). При секвенировании использовали универсальные бактериальные праймеры 11F (5' AGTTTGATCATGGCTCAG 3') – 1100R (5' GGGTTGCGCTCGTTG3') [7]. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК (длина прочтения 800 нуклеотидов) выравнивали в программах Bioedit Version 7.0.4. и ClustalW [8]; наличие химер проверяли в программе Pinal [9]. Выровненные последовательности сравнивали с хранящимися в Мировой базе данных NCBI данными, с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности идентифицировали до вида или рода на уровне сходства больше 98%.

Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей и построение дендрограмм проводили с использованием пакета программ MEGAX [10] и с использованием пакета программ «Robust Phylogenetic analysis for the non-Specialist», представленный на сайте <http://www.phylogeny.fr/>.

Угледородоокисляющую активность определяли с помощью Хромато-масс-спектрометра Shimadzu GCMS 2010 Ultra на базе ТОИ ДВО РАН.



А



Б

А – Карта расположения станций и распределения содержания метана в донных отложениях северной части Японского моря. Условное разделение районов исследования: 1 – газогидратный район; 2 – район с повышенными концентрациями метана. Б – Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий, выделенных из донных отложений северной части Японского моря. Длина масштабной линейки: 1 замена на 100 нуклеотидов

Из 22 проб восстановленного слоя донных отложений было выделено 55 штаммов, обладающих способностью к окислению углеводов в аэробных условиях. Штаммы, способные к аэробной деструкции относились к филумам Proteobacteria (Gammaproteobacteria), Firmicutes, Actinobacteria. Филогенетическое дерево представлено на рисунке.

47 из них обладали способностью к утилизации углеводов, как в аэробных, так и в анаэробных условиях и относились к родам *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*.

На примере, штаммов *Bacillus kyonggiensis* POI87 и *Psychrobacter piscatorii* POI185 было выявлено, что анаэробных условиях с наибольшей интенсивностью окислялись легкие углеводороды с длинной цепи от C9 до C10 и C12, соответственно. А в присутствии кислорода в наибольшей степени утилизировались углеводороды C17-C21.

Работа выполнена в рамках темы Госзадания: 2019-2023, 0211-2021-0012 «Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, геохимических, геологических процессов и ресурсов Мирового океана», № гос. рег. АААА-А19-119122090009-2.

Список цитируемой литературы

1. Li H., Yang S.Z., Mu B.Z. Phylogenetic diversity of the archaeal community in a continental high temperature, water-flooded petroleum reservoir // *Current Microbiology*. – 2007. – V. 55. Iss. 5. – P. 382–388.
2. Silva T.R., Verde L.C.L., Santos Neto E.V., Oliveira V.M. Diversity analyses of microbial communities in petroleum samples from Brazilian oil fields // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2013. – Vol. 81. – P. 57-70.
3. Chanton, J., T. Zhao, B.E. Rosenheim, Joye S., Bosman S., Brunner C., Yeager K.M., Diercks A.R., Hollander D. Using natural abundance radiocarbon to trace the flux of petrocarbon to the seafloor following the Deepwater Horizon oil spill // *Environmental Science & Technology*. – 2015. – V. 49 – P. 847–854.
4. Leu J.Y., McGovern-Traa C. P., Porter et al. A.J. The same species of sulphate-reducing *Desulfomicrobium* occur in different oil field environments in the North Sea // *Letters in Applied Microbiology*. – 1999. – V. 29, Iss. 4. -P. 246–252.
5. Da Cruz G.F., Vasconcellos S.P., Angolini C. F. Could petroleum biodegradation be a joint achievement of aerobic and anaerobic microorganisms in deep sea reservoirs? // *AMB Express*. – 2011. – V.1. – №47. – P. 1-10.
6. Шакиров Р. Б., Обжиров А. И., Шакирова М. В., Мальцева Е. В. О газогидратах окраинных морей Восточной Азии: закономерности генезиса и распространения (обзор) // *Геосистемы переходных зон*. – 2019. – Т. 3. – № 1. – С. 65-106.
7. Seki T., Matsumoto A., Ōmura S., Takahashi Y. Distribution and isolation of strains belonging to the order Solirubrobacterales // *The Journal of Antibiotics*. – 2015. – Vol.68. – P. 763–766.
8. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* – 1994 – V.22. – P. 4673–4680.
9. Ashelford K.E. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V.71. – P.7724–7736.
10. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК Т- И В-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, TREC И KREC, КАК МЕТОД ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

Порубов В.С.^{1,2}, Заморина С.А.¹

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²ГБУЗ ПК «Краевая детская клиническая больница», Пермь, Россия

Ключевые слова: иммунитет, фенилкетонурия, TREC, KREC

Фенилкетонурия (ФКУ) – это наследственное заболевание, характеризующееся повышенным содержанием фенилаланина (ФА) в крови, т.е. гиперфенилаланинемией (ГФА) [1,2]. В связи с повышенным уровнем ФА и его метаболитов у пациентов с ФКУ страдают структуры центральной нервной системы [2]. При отсутствии лечения всегда развивается тяжелая умственная отсталость и другие неврологические симптомы [1]. Однако даже в случае раннего начала лечения у пациентов наблюдаются различные неврологические нарушения [2]. Причем эти изменения ожидаемо коррелирует с увеличением продолжительности периодов повышения концентрации ФА в крови [2]. Основным видом терапии при ГФА является диета с ограничением поступления фенилаланина с пищей [1,2]. Уровень естественного белка, допустимого к употреблению, должен быть строго ограничен.

Повышенная частота инфекций и снижение иммунного ответа у людей с общей белково-калорийной недостаточностью хорошо известны [3]. В частности, и у детей с ФКУ ограничения в питании и повышенный уровень ФА в крови, по данным различных исследований [1,4] приводят к отклонениям в аминокислотном и микроэлементном составе плазмы крови и, как следствие, к отклонениям в различных показателях иммунной системы. По сравнению со здоровыми детьми, дети с фенилкетонурией преимущественно показывают значимое снижение уровней иммуноглобулинов в крови [4]. Причем у детей с ФКУ, плохо соблюдающих диету, уровень иммуноглобулинов ожидаемо выше, чем у детей на строгой диете [4]. Отмечают также и отклонения в клеточном иммунитете [1].

Большая часть исследований иммунитета больных с ФКУ датирована 1970-80 гг. На сегодняшний день нам доступны более широкие возможности оценки иммунного статуса. В частности, перспективным представляется метод оценки иммунного статуса при помощи определения уровней молекул TREC и KREC [5,6].

Как известно [7], многообразие антигенных детерминант достигается за счет процесса рекомбинации (реаранжировки) генов V, J и (в некоторых случаях) D сегментов, происходящего при созревании Т- и В-клеток, когда из многих десятков генов, кодирующих отдельные сегменты, остается по одному гену. Удаление промежуточных участков происходит путем соединения крайних точек вырезаемого фрагмента и замыкания удаляемого участка в кольцо. Получившиеся в результате кольцевые фрагменты ДНК и носят название TREC и KREC. ТРЭКи (эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора, TREC) образуются при созревании Т-клеточного рецептора, а КРЭКи (рекомбинационные кольца к-делеционного элемента, KREC) – при созревании В-лимфоцитов [5,6,7]. Количественная оценка TREC и KREC коррелирует с уровнем несущих эти молекулы лимфоцитов, позволяя выявить Т- и В-клеточную лимфопению. Показано, что различные варианты иммунной недостаточности сопровождаются снижением уровня молекул TREC и/или KREC [5].

Наибольшее число исследований посвящено оценке возможности использования TREC/KREC-анализа в неонатальном скрининге первичных иммунодефицитов (ПИД) из сухих пятен крови новорожденных [5,6].

Но помимо скрининга ПИД, возможно и иное применение TREC/KREC-анализа. В частности, этот метод начинают использовать для динамической оценки иммунного статуса после проведения ТГСК или в процессе лечения онкологических больных [5].

В нашей работе мы планируем провести оценку уровня клеточного иммунитета пациентов с диагнозом «фенилкетонурия» при помощи TREC/KREC анализа, с целью определения влияния на иммунитет особенностей диеты и динамики уровня ФА в крови.

На сегодняшний день нами обследовано 15 пациентов. Проведено исследование из образцов сухих пятен крови, взятых для планового определения уровня фенилаланина в крови в феврале-марте 2021 года. Из них, 14 пациентов с диагнозом «фенилкетонурия классическая», с мутациями в гене PАН и один пациент с атипичной формой ГФА, с мутациями в гене PTS. Все больные наблюдаются у врача-генетика в ГБУЗ ПК «КДКБ» и регулярно сдают анализы для определения уровня ФА в крови.

Исследование уровней TREC и KREC проводилось на базе ПЦР-лаборатории Пермского государственного национального исследовательского университета, Пермь, Россия.

Выделение ДНК из сухих пятен для проведения исследования проводили при помощи набора «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия) по протоколу в модификации [6] для оптимизации выделения ДНК из сухих пятен крови. Анализ концентрации и качества выделенной ДНК проводился на спектрофотометре Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Для определения уровней молекул TREC и KREC использовали мультиплексную тест-систему «БиТ-тест», разработчик ООО «АБВ-тест» [8]. ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) по протоколу, определенному производителем тест-системы.

В результате анализа среднее значение количества молекул TREC составило 6351,25 коп./10*5 клеток [391,89; 28509,01], для KREC это значение составило 2665,77 коп./10*5 клеток [179,28; 9846,85].

В группе обследуемых пациентов было 9 человек младше 7-ми лет, и 6 человек старше 7-ми лет. Среднее значение количества молекул TREC в младшей группе составило 7772,18 коп./10*5 клеток [2574,15; 28509,01], в старшей группе – 4219,84 коп./10*5 клеток [391,89; 10009,01]. Однако, согласно критерия Манна – Уитни, это различие оказалось статистически незначимым. Для уровня молекул KREC разница также оказалась статистически незначимой: 2983,30 [1154,55; 9846,85] и 2189,49 [179,28; 3240,11] коп./10*5 клеток соответственно.

По гендерному признаку были представлены 5 пациентов женского пола и 10 пациентов мужского пола. Здесь также не обнаружено статистически значимых различий по уровням молекул TREC и KREC между группами. Для TREC средние значения по группам составили 4503,62 [2574,15; 5918,92] и 7275,06 [391,89; 28509,01] коп./10*5 клеток соответственно, для KREC – 2515,78 [1444,84; 3424,67] и 2740,77 [179,28; 9846,85].

По уровню ФА в крови: у 10 пациентов уровень ФА в пределах нормы (< 6 мг/дл), у 5 пациентов – выше нормы. Статистически значимых различий по уровням молекул TREC и KREC между группами пока также не было обнаружено. Для TREC средние значения по группам составили 6845,40 [391,89; 28509,01] и 5362,94 [4874,29; 5918,92] коп./10*5 клеток соответственно, для KREC – 3064,00 [179,28; 9846,85] и 1869,33 [1154,55; 3161,26].

Очевидно, что для полноценной оценки результатов необходимо больше данных. В дальнейшем предполагается оценить показатели уровней молекул TREC и KREC в динамике при различном уровне ФА в крови, и сравнить полученные данные с данными контрольной группы условно здоровых пациентов. Однако уже сейчас можно обратить внимание на показатели Пациента-50 (количество молекул TREC составило 179,28) и Пациента-62 (количество молекул TREC составило 508,11). Оба пациента (в отличие от остальных) принимают специализированный лекарственный препарат Куван® (Сапроптерин). Причем у Пациента-50 атипичная форма ГФА, с мутацией в гене PTS, а у Пациента-62 классическая форма ФКУ. Также можно отметить, что медианное значение количества молекул TREC выше

в группе пациентов с повышенным уровнем ФА в крови (5211,71 против 3050,23), что согласуется с данными [1].

Итак, основную роль в снижении иммунного ответа у пациентов с ФКУ играют вынужденные диетические ограничения, приводящие к ограничению поступления ряда веществ, необходимых для полноценной работы организма, в частности, для формирования клеток иммунной системы. Важно также отметить, что при любом отклонении в состоянии соматического здоровья пациентов с ФКУ происходит неизбежное повышение концентрации эндогенного ФА в крови, вызванное повышением катаболизма [1,4].

Таким образом, оценка иммунного статуса пациентов с фенилкетонурией может стать важным маркером адекватности проводимой диетотерапии, что в свою очередь приведет к укреплению иммунитета, снижению уровня инфекционных заболеваний, и в итоге к нормализации уровня ФА в крови.

Список цитируемой литературы

1. Бушуева Т.В. Диетотерапия при наследственной патологии обмена веществ, выявляемой по неонатальному скринингу /Дисс. на соискание ученой степени д.м.н., Москва, 2015.
2. Blau N., Van Spronsen F.J., Levy H.L. Phenylketonuria// Lancet. 2010. – V.376. – № 9750. – P.1417–27.
3. Scrimshaw N.S., Taylor C.E., Gordon J.E. & World Health Organization. Interactions of nutrition and infection. World Health Organization monograph series; no. 57, 1968.
4. Gropper S.S., Chaung H., Bernstein L.E. Immune Status of Children with Phenylketonuria // Journal of the American College of Nutrition.- 1995.-V.14.- №3.- P.264-270.
5. Образцов И.В., Продеус А.П., Румянцев А.Г. Эксцизионные кольца Т-клеточного рецептора и рекомбинантные кольца К-делеционного элемента: иммунобиология, подходы к оценке, применение в клинической практике. Российский иммунологический журнал.- 2015.- Т.9(18).- №3.- С.251-260.
6. Дерябина С.С. Роль количественного определения кольцевых участков ДНК Т-клеточного и В-клеточного рецепторов лимфоцитов в оценке функционирования иммунной системы новорожденных и детей первого года жизни /Дисс. на соискание ученой степени к.б.н., Екатеринбург, 2017.
7. Dion M-L., Sekaly R.P., Cheynier R. Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles // Methods Mol. Biol.- 2007.- V.380.- P.197-213.
8. Гордукова М.А., Продеус А.П., Филипенко М.Л., Корсунский И.А. Способ диагностики иммунной системы и набор для оценки ДНК молекул TREC, KREC и количество геном эквивалентов ДНК/ Патент РСТ/RU2016/000514 от 05.08.2016.

БИОТОПИЧЕСКАЯ ПРИУРОЧЕННОСТЬ И ЖИЗНЕННЫЕ ФОРМЫ МУРАВЬЁВ КУНГУРСКОЙ ЛЕСОСТЕПИ

Поспелова А.Д.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: муравьи, Кунгурская лесостепь, биотопические предпочтения

Муравьи – важный компонент всех наземных биогеоценозов. Причем все виды муравьёв, обитающие в одном биогеоценозе, распределены таким образом, чтобы максимально полно использовать все его пищевые ресурсы без сильной конкуренции между видами [6]. В тех местообитаниях, где выражена ярусность биогеоценозов, муравьи делят среду главным образом по вертикали [3].

Мирмекофауна Кунгурской островной лесостепи изучена достаточно полно [2, 7]. Однако вопросы экологии муравьев, в частности, биотопические предпочтения и разнообразие жизненных форм муравьев в условиях Кунгурской лесостепи, остаются практически не изученными. В связи с этим целью нашей работы было изучение видового состава муравьев в ряде пунктов Кунгурской лесостепи с последующим анализом биотопического распределения и жизненных форм основных видов.

Сбор муравьев проводился по методу Огаты [8] на 9 участках в окрестностях г. Кунгур, на разных удалениях от города. Участки для обследования выбирались таким образом, чтобы охватить максимальное количество фитоценозов. На каждом участке было заложено несколько учетных площадок (от 6 до 18), во всех биотопах, представленных на данном участке. В дальнейшем биотопы были сгруппированы по типам растительности. Всего было выделено 7 биотопов: 1) Разнотравный луг, 2) Берёзовый лес (включая сосново-берёзовый), 3) Опушка березняка, 4) Сосновый лес, 5) Опушка сосняка, 6) Темнохвойный лес (пихтово-еловый и елово-сосновый), 7) Опушка темнохвойного леса.

Биотопические предпочтения основных видов муравьев оценивали с помощью показателя степени биотопической приуроченности Ю.А. Песенко [5]. Данный показатель изменяется от -1 до +1 и отражает степень предпочтения (избегания) конкретного биотопа конкретным видом. Этот показатель позволяет более точно определить понятие эври- или стенопотности вида.

Жизненные формы муравьев выделены по К.В. Арнольди [1]:

1) Геобионты: живут в почве и выходят из неё только при вылете половых особей.
2) Герпетобионты: живут в почве, но пищу добывают на её поверхности или в травяно-кустарничковом ярусе.

3) Дендробионты: живут в живых или усыхающих деревьях и пнях.

Для лесостепной зоны характерно наличие ещё одной жизненной формы [4]:

4) Стратобионты: обитают в подстилке.

Всего на учетных площадках обнаружено 16 видов муравьев (табл.).

К стенопотным видам, предпочитающим разнотравные луга, относятся *Murmys rugulosa*, *Formica rufibarbis*, *F. cunicularia* и *Lasius alienus*. При этом *M. rugulosa* является стратобионтом, а остальные виды относятся к герпетобионтам.

Индекс биотопической приуроченности муравьев Кунгурской лесостепи

Вид муравьев \ Номер биотопа*	1	2	3	4	5	6	7
<i>M. scabrinodis</i>	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>M. schencki</i>	-1,0	0,4	0,8	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>M. sulcinodis</i>	-1,0	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>M. rugulosa</i>	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>T. caespitum</i>	0,0	-1,0	0,1	0,6	-1,0	-1,0	0,1
<i>L. acervorum</i>	-1,0	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>F. polystena</i>	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,9	0,8
<i>F. rufibarbis</i>	0,7	-1,0	-0,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>F. cunicularia</i>	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>F. fusca</i>	-0,5	0,3	0,3	-1,0	0,4	-1,0	-1,0
<i>L. niger</i>	0,2	-0,5	-0,2	0,1	0,3	0,2	-1,0
<i>L. alienus</i>	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0
<i>L. longiceps</i>	-0,1	-0,0	-0,3	0,6	0,5	-1,0	0,1
<i>L. flavus</i>	0,2	0,3	-0,2	-1,0	0,3	-1,0	-1,0
<i>L. umbratus</i>	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	1,0
<i>L. fuliginosus</i>	-1,0	1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0

* Номера биотопов как в тексте.

К видам, предпочитающим темнохвойные леса, относятся *F. polystena* и *L. umbratus*. *F. polystena*, в отличие от других представителей рода *Formica*, предпочитает более увлажненные участки. Поселяется в темнохвойных лесах и на их опушках. Данный вид является герпетобионтом. *L. umbratus* – геобионт, предпочитает только опушки темнохвойных лесов.

Берёзовые леса и их опушки предпочитают такие виды, как *Myrmica scabrinodis*, *M. schencki*, *Leptothorax acervorum* и *Lasius fuliginosus*. Это мезофилы, предпочитающие среднюю температуру и влажность. *M. scabrinodis* и *M. schencki* являются стратобионтами, поселяются в подстилке и среди густой растительности, а *L. fuliginosus* – типичный дендробионт, устраивающий гнёзда в поваленных или трухлявых деревьях. Так же дендробионтом является *L. acervorum*. Его гнёзда располагаются в основном у самых оснований деревьев, а для фуражировки он поднимается выше по стволу дерева.

К видам, предпочитающим сосновые леса и их опушки относятся *M. sulcinodis*, *T. caespitum*, *L. longiceps*. В данном биогеоценозе хорошо представлены различные жизненные формы муравьёв в зависимости от яруса. *T. caespitum* – герпетобионт, охотится на поверхности почвы и в травостое. *M. sulcinodis* является стратобионтом, фуражирует в подстилке соснового леса, а *L. longiceps* – геобионт и практически никогда не появляется на поверхности почвы.

Такие виды, как *L. niger*, *L. flavus*, и *F. fusca*, обладают высокой экологической пластичностью и могут поселяться в различных биотопах. *L. niger* является герпетобионтом. Он поселяется на разнотравных лугах, в сосновых лесах и на их опушках, а также в темнохвойных лесах. Но отчетливо избегает березняки, их опушки и опушки темнохвойных лесов, вероятно из-за сильной конкуренции с другими видами.

L. flavus – геобионт, поселяется на лугах, в березняках и на опушках сосновых лесов. *F. fusca* так же предпочитает березняки и опушки берёзовых и сосновых лесов, но является типичным герпетобионтом. В отличие от других видов подрода *Serviformica*, предпочитающих разнотравные луга, *F. fusca* отчетливо их избегает.

Таким образом, нашими исследованиями в Кунгурской лесостепи было выявлено 16 видов муравьёв, из них 13 видов – стенобионтных и 3 вида – эврибионтных. Муравьи представлены герпетобионтными, геобионтными, стратобионтными и дендробионтными жизненными формами.

Список цитируемой литературы

1. Арнольди К.В. Жизненные формы у муравьёв // Докл. АН СССР. – 1937. – Т. 16. – № 6. – С. 343 – 345.
2. Гридина Т.И. Географический анализ фауны муравьёв Пермской области // Географический вестник. – 2006. – № 1. – С. 145 – 148.
3. Длусский Г.М., Союнов О.С., Забелин С.И. Муравьи Туркменистана. – Ашхабад, 1990. – С. 158 – 160.
4. Захаров А.А., Захаров Р.А. Муравьи и позвоночные животные. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2019. – 186 с.
5. Песенко Ю.А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. – М.: Наука, 1982. – 287 с.
6. Сарапий М.И. Фауна и экология муравьёв рода *Lasius* (Hymenoptera, Formicidae) Центрального Предкавказья // Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Сер. Естественные науки. – 2008. – №3. – С. 75 – 78.
7. Сейма Ф. А. Структура населения муравьёв тайги. – Пермь: Изд-во Перм. гос. ун-та, 2008. – 166 с.
8. Ogata K. Measuring biodiversity of ants (Hymenoptera: Formicidae) // 20 Int. Congr. Entomol. – Firenze, 1996. – P. 96.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СРЕДЫ НА КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС ПРОИЗВОДНОЙ F-ПЛАЗМИДЫ В КЛЕТКИ *ESCHERICHIA COLI*

Поспелова Ю.С., Ремезовская Н.Б., Кузнецова М.В.

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

Ключевые слова: штаммы *Escherichia coli*, конъюгация, температура, кислотность, антибиотики

Актуальность. Резистентность микроорганизмов к широкому спектру антибактериальных препаратов является серьезной проблемой общественного здравоохранения [1], в связи с чем в последнее время механизм распространения устойчивости к антибиотикам посредством горизонтального переноса генов получил повышенное внимание со стороны научного сообщества [2,3]. Известно, что конъюгация происходит как в организме человека, так и в окружающей среде, потому активно ведется изучение влияния большого количества биотических и абиотических факторов на эффективность данного процесса [4].

Цель исследования – оценить влияние температуры, кислотности и присутствия антибиотиков в среде на конъюгативный перенос производной F-плазмиды в клетки *E. coli* в планктоне и биопленке.

Методы и материалы. В работе в качестве донора плазмидной ДНК был использован рекомбинантный штамм *E. coli* N4i рОХ38 Gm^rCm^r [5]. Реципиентами являлись культуры уропатогенной *E. coli* Amp^r (n=6). Конъюгативный перенос осуществляли в среде Лурия-Бертани в течение 24 ч в полистироловых планшетах. Частоту конъюгации оценивали, как соотношение числа клеток трасконъюгантов к числу клеток реципиентов [6]. Антибиотики использовали в суббактериостатических концентрациях для исследуемых культур (определяли заранее). Уровень pH доводили с помощью 1М NaOH и 1М HCl.

Результаты. Конъюгативный перенос плазмиды рОХ38 был осуществлен во все реципиентные штаммы *E. coli*, его эффективность в контрольном варианте (37 °С, нейтральная pH, отсутствие антибиотиков) варьировала от 3,30E-06±1,52E-06 до 7,78E+00±1,35E+01 в планктоне и от 2,75E-05±3,18E-05 до 1,15E-01±1,63E-01 в биопленке.

Частота конъюгации в планктоне для большей части штаммов была выше при 37 °С: средняя частота конъюгации при 37 °С и 20 °С составила 7,34E-04±1,32E-03 и 1,33E-04±2,35E-04 соответственно (табл.). Частота переноса плазмиды в биопленке была выше и при 37 °С, и 20 °С при (1,64E-02±2,96E-02 и 4,32E-04±5,67E-05), чем в планктоне. Несмотря на отличие эффективности в частоте конъюгации в биопленке при двух температурах, разница оказалась статистически незначимой. Отклонение уровня кислотности среды от оптимального (pH 7,0-7,5) в кислую сторону (pH 5,0-5,5) оказалось более благоприятным для роста *E. coli* и передачи плазмиды по сравнению с более щелочными условиями (pH 8,0-8,5). Однако, стоит отметить, что данный фактор также незначительно изменял эффективность переноса как в планктоне, так и в модели биопленки.

Добавление в среду суббактериостатических концентрации антибиотиков (ампициллин, цефотаксим и ципрофлоксацин) снижало эффективность переноса, однако более выраженный эффект оказывал только цефотаксим, снижая частоту почти на два порядка: 1,95E-06±2,78E-05 в планктоне и 3,45E-05±3,01E-05 в биопленке.

Вывод. Таким образом, перенос детерминант устойчивости путем конъюгации в клетки клинических штаммов *E. coli* может эффективно происходить в широком диапазоне условий, включая неоптимальную для роста бактерий температуру и кислотность окружающей среды, а также давление факторов отбора (антибиотики).

Частота конъюгации производной F-плазмиды в клетки *E. coli* при разных условиях

Условие	Планктон	Биопленка
37 °С (контроль)	7,34E-04±1,32E-03	1,64E-02±2,96E-02
20 °С	1,33E-04±2,35E-04	4,32E-04±5,67E-05
pH 5,0-5,5	2,71E-04±1,75E-04	4,21E-04±5,98E-05
pH 7,0-7,5	6,54E-04±2,23E-05	3,74E-03±7,34E-04
pH 8,0-8,5	4,98E-05±5,87E-04	2,56E-05±7,75E-04
Ампициллин	5,87E-05±9,05E-04	3,76E-03±8,45E-02
Цефотаксим	1,95E-06±2,78E-05	3,45E-05±3,01E-05
Ципрофлоксацин	9,21E-05±3,65E-05	5,32E-04±2,21E-04

Работа выполнена по гранту РФФИ № 19-44-590014-п_a.

Список цитируемой литературы

1. Smith R., Coast J. The true cost of antimicrobial resistance // BMJ. – 2013. – V. 346: f1493.
2. Sun D., Jeannot K., Xiao Y. *et al.* Editorial: Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10: 1933.
3. Bethke J.H., Davidovich A., Cheng L. *et al.* Environmental and genetic determinants of plasmid mobility in pathogenic *Escherichia coli* // Sci. Advances. – 2020. – V. 6(4).
4. Fernandez-Astorga A., Muela A., Cisterna R. *et al.* Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – V. 58. – P. 392-398.
5. Starčič Erjavec, Petkovsek Z., Kuznetsova M.V. *et al.* Strain ŽP – the first bacterial conjugation-based «kill»–«anti-kill» antimicrobial system // Plasmid. – 2015. – V. 82. – P. 28-34.
6. Guglielmetti S., Tamagnini I., Minuzzo M. *et al.* // Curr. Microbiol. – 2009. – V. 59 (2). – P. 167-172.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И ПРОМЫШЛЕННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИ СТРОИТЕЛЬСТВЕ ТРУБОПРОВОДОВ

Проничева К.А.

Тюменский индустриальный университет, Тюмень, Россия

Ключевые слова: трубопроводы, промышленная безопасность, экологическая безопасность

Трубопроводы представляют собой сложную техногенную систему. Повышение экологической безопасности при строительстве трубопроводов является проблемой, которая требует систематизации методов расчета и создания банка данных по безопасности трубопроводов.

Воздействие трубопроводов на окружающую среду состоит из двух аспектов: строительства и эксплуатации, однако период строительства оказывает большее влияние на экологию пострадавшего района. Неизбежно, установка трубопровода приводит к экологическим нарушениям, так как происходит очистка от растительности, земляные работы, уплотнение почвы и другие.

© Проничева К.А., 2021

Кроме того, из-за линейного расположения трубопроводов различные природно-климатические зоны с различными геологическими, гидрологическими условиями подвержены техногенному воздействию [1].

Наиболее опасными производственными факторами при строительстве трубопроводов являются:

- напряжение в электрической цепи;
- повышенная и пониженная температура воздуха рабочей среды;
- падение с высоты;
- повышенная запыленность и загазованность;
- вибрации;
- ультразвук;
- неисправность грузоподъемных средств;
- пожароопасность и взрывоопасность [2].

Непосредственно, сам работодатель должен обеспечивать безопасные условия труда при строительстве трубопроводов, а также обучить персонал в области вопросов промышленной безопасности, для чего перед работами проводится аттестация знаний. При выполнении земляных, монтажных, изоляционных, антикоррозионных, пневматических и гидроизоляционных работах и испытаний должны предусматриваться мероприятия по предупреждению воздействия опасных производственных факторов. К таким мероприятиям можно отнести:

1. Наличие ограждений и обозначения траншей и углублений;
2. Наличие путей обхода и объезда;
3. Расстановка сигнальных средств;
4. Отсутствие посторонних лиц при проведении изоляционных работ;
5. Применение СИЗ.

Наиболее опасным состоянием окружающей природной среды вследствие строительства трубопроводов являются [2]:

- разрушение почвенного покрова;
- разрушение растительного мира;
- активизация оползней, эрозии почв;
- гибель гидробионтов;
- переформирование русла рек и дна;
- ухудшение качества природных и подземных вод;
- изменение геологических условий мерзлых грунтов;
- ухудшение биопродуктивности водных объектов.

Основными экологическими аспектами при строительстве трубопроводов являются предотвращение развития опасных мерзлотных процессов (с учетом температуры транспорта газа) на береговых и пойменных участках перехода в зонах вечномерзлых грунтов, особенно на границах выхода подводного газопровода из русла и входа в вечномерзлые породы берегов, эксплуатационная надежность конструкции, укрепление береговых склонов, а также установка утяжеляющих балластных грузов, проведение строительных работ после нереста рыб [3].

Так же при строительстве трубопроводов необходимо предусматривать мероприятия по рекультивации земель, если трубопроводы строятся наземным или подземным способом. В качестве мероприятий по рекультивации необходимо особое внимание уделять биологическому этапу. Например, посев трав, таких как овсяница луговая, волосинец сибирский, мятлик луговой, клевер красный, тимофеевка луговая не требовательны в уходе, а также показывают хорошую всхожесть семян.

Характеристики технических средств, применяемых для подводных земляных работ при строительстве подводных переходов магистральных трубопроводов и условия их применения в целях обеспечения экологической безопасности представлены в таблице [3].

Характеристики технических средств, применяемых для подводных земляных работ при строительстве подводных переходов магистральных трубопроводов и условия их применения в целях обеспечения экологической безопасности

Наименование	Рациональность применения	Условия применения в целях обеспечения экологической безопасности
Землесосные снаряды	На больших переходах через судоходные реки при объемах разработки грунта свыше 300 000 м ³	Только при обязательном оснащении землеснарядов рефулерами, обеспечивающими дальность транспортировки пульпы в отвал согласно производительности земснарядов
Траншейные землеснаряды	При объемах разработки грунта от 100 000 до 300 000 м ³	
Сборно-разборные землеснаряды	На средних переходах через судоходные реки при объемах разработки-грунта 50 000 м ³	
Многочерпаковые землеснаряды	На больших переходах через судоходные реки на грунтах IV – VII групп с объемом разработки грунта от 30 000 до 100 000 м ³	Только при полной гарантии исключения сброса грунта в водоем; Только при вывозе извлекаемого грунта шаландами в согласованные места отвалов в пределах до 15 км
Одноковшные гидравлические землеснаряды		
Гидромониторы	Для планировки и доработки траншей водолазами с объемом не более 5 000 м ³	Не обеспечиваются
Грунтонасосы		Не обеспечиваются
Экскаватор на понтоне из труб	На замкнутых водоемах и малых реках при глубине воды свыше 1,5 м	Обеспечиваются при выгрузке грунта на плав. средства или на берега

Таким образом, наиболее опасными производственными факторами при строительстве трубопроводов являются напряжение в электрической цепи, повышенная и пониженная температура воздуха рабочей среды, падение с высоты, пожароопасность и взрывоопасность и др. В целях обеспечения промышленной безопасности необходимо выполнять такие мероприятия, как расстановка сигнальных средств, отсутствие посторонних лиц при проведении изоляционных работ, применение СИЗ и др.

Наиболее опасными последствиями вследствие строительства трубопроводов являются разрушение почвенного и растительного покрова, ухудшение качества природных и подземных вод, гибель гидробионтов, изменение геологических условий мерзлых грунтов. Важными мероприятиями в целях сохранения экологии природных ресурсов нужно предусматривать: предотвращение развития опасных мерзлотных эксплуатационную надежность конструкций, укрепление береговых склонов, строительных работ после нереста рыб, рекультивацию земель.

Список цитируемой литературы

1. Щербаков, С.Г. Проблемы трубопроводного транспорта нефти и газа / С.Г. Щербаков. – Москва: Наука, 2002. – 203 с.
2. Юфина, В.А. Трубопроводный транспорт нефти и газа / В.А. Юфина. – Москва: Недра, 2005. – 407 с.
3. Фриман, Р.Э. Магистральные трубопроводы / Р.Э. Фриман. – Москва: Недра, 2006. – 160 с.

РАЗНООБРАЗИЕ *benA*-ГЕНОВ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *MICROCOCACEAE*

Пьянкова А.А.¹, Малышева А.А.², Ястребова О.В.¹

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

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, семейство *Micrococcaceae*, ген *benA*

В результате промышленных солеразработок на территории Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (Пермский край) образуются природно-антропогенные ландшафты, характеризующиеся повышенным уровнем засоления и загрязнением моно(поли)ароматическими углеводородами и их производными, галогенсодержащими органическими соединениями и фталатами [1]. В таких условиях формируются микробные сообщества, в состав которых входят галофильные и галотолерантные бактерии-деструкторы ароматических соединений различных таксономических групп. Одним из промежуточных продуктов окислительного катаболизма многих ароматических соединений у бактерий является бензойная кислота. «Классический» путь разложения бензойной кислоты, который наиболее часто встречается у бактерий, начинается с внедрения гидроксигрупп в химически стабильное ароматическое кольцо молекулы под действием фермента бензоат 1,2-диоксигеназы, кодируемой геном *benA* [2].

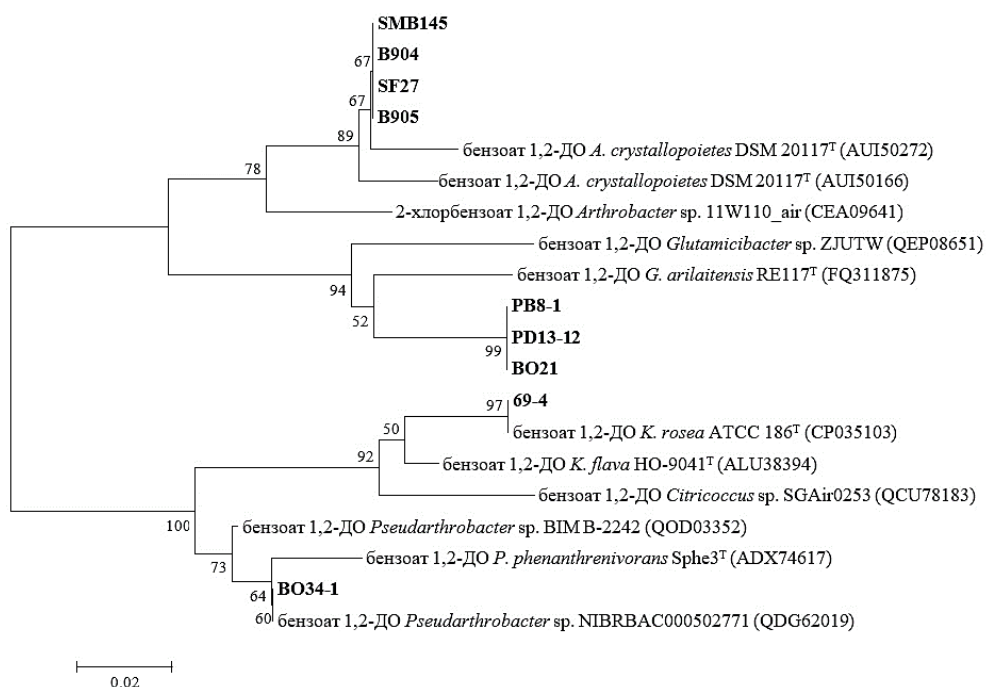
Цель работы – изучение разнообразия *benA*-генов бактерий семейства *Micrococcaceae*, выделенных из различных биотопов района промышленных разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей.

Из рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» было отобрано 9 штаммов бактерий семейства *Micrococcaceae*, изолированных из образцов ризосферы растений, почвы, отходов производства, глубинной породы каменной соли района солеразработок (г. Соликамск, г. Березники, Пермский край). На основе идентификации по гену 16S рРНК установлено, что отобранные штаммы бактерий филогенетически близки типовым штаммам семейства *Micrococcaceae*: *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117^T, *Glutamicibacter arilaitensis* Re117^T, *Kocuria rosea* DSM 20447^T и *Pseudoarthrobacter oxydans* DSM 20119^T (уровень сходства 99,21-100%).

Исследуемые штаммы бактерий являются деструкторами ряда моно- и полиароматических соединений, таких как салициловая, гентизиновая, орто-фталевая кислоты, нафталин, бифенил [1]. Все 9 штаммов бактерий способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии бензойную кислоту. Так, при культивировании в жидкой минеральной среде Раймонда [3] с добавлением 30 г/л хлорида натрия и бензойной кислоты (1 г/л) в качестве субстрата, исследуемые бактерии демонстрировали увеличение оптической плотности (ОП₆₀₀) культуральной жидкости до 0,6-0,7 ед.

Амплификацию *benA*-гена проводили с использованием праймеров и условий, описанных [4]. В результате, со всех ДНК-матриц исследуемых штаммов был получен ПЦР-продукт искомого размера (521 п. н.). Секвенирование и последующее сравнение амплифицированных фрагментов *benA*-генов с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank показали, что наибольшее сходство изучаемые последовательности имеют с генами α -субъединиц бензоат 1,2-диоксигеназы и 2-хлорбензоат 1,2-диоксигеназы бактерий родов *Arthrobacter*, *Glutamicibacter*, *Citricoccus*, *Kocuria* и *Pseudarthrobacter*.

На филогенетическом дереве (рис. 1) приведены транслированные аминокислотные последовательности (ТАП) *benA*-генов исследуемых штаммов, а также ближайших гомологичных генов представителей семейства *Micrococcaceae*. Изучаемые последовательности формируют на дереве несколько кластеров. ТАП *benA*-генов штаммов *Arthrobacter* sp. SMB145, B904, B905 и SF27 идентичны между собой и имеют наибольшее сходство с генами большой субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117^T, с которым данные штаммы филогенетически близки по гену 16S рРНК, а также с геном 2-хлорбензоат 1,2- диоксигеназы штамма *Arthrobacter* sp. 11W110_{air}. Стоит отметить, что при анализе полного генома штамма *Arthrobacter* sp. B905 была выявлена еще одна последовательность гена *benA* (рис.).



Положение *benA*-генов исследуемых штаммов семейства *Micrococcaceae* на филогенетическом дереве, построенном на основании сравнительного анализа транслированных аминокислотных последовательностей *benA*-генов с использованием метода «neighbor-joining»

Штаммы PB8-1, PD13-12, BO21 имеют идентичные ТАП генов *benA* и формируют отдельную ветвь на филогенетическом дереве. При этом штамм PD13-12 по гену 16S рРНК является филогенетически близким с *Pseudarthrobacter sulfonivorans* ALL^T, штамм BO21 – с *Pseudoarthrobacter oxydans* DSM 20119^T, а штамм PB8-1 – с *Glutamicibacter arilaitensis* Re117^T. Сравнимые последовательности генов *benA* этого кластера показали наибольшее сходство с генами α -субъединицы бензоат 1,2-диоксигеназы *Glutamicibacter arilaitensis* Re117^T и штамма *Glutamicibacter* sp. ZJUTW.

Транслированная аминокислотная последовательность гена *benA* штамма BO34-1, сходного по гену 16S рРНК с *Pseudoarthrobacter oxydans* DSM 20119^T, формирует на дереве отдельный кластер и является наиболее филогенетически близкой с последовательностями *benA* генов бактерий рода *Pseudarthrobacter*. Аминокислотная последовательность гена *benA*

штамма 69-4, сходного по гену 16S рРНК с *Kocuria rosea* DSM 20447^T, также формирует на филогенетическом дереве отдельную ветвь с последовательностями генов бензоат 1,2-диоксигеназы бактерий рода *Kocuria* и штамма *Citricoccus* sp. SGAir0253 (рис.).

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что бактерии семейства *Micrococcaceae*, выделенные из района разработок ВМКМС, содержат разнообразные гены деструкции бензойной кислоты – ключевого метаболита разложения моно(поли)ароматических соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта №19-44-590011p_a.

Список цитируемой литературы

1. Ястребова О.В., Плотникова Е.Г. Филогенетическое разнообразие бактерий семейства *Micrococcaceae*, выделенных из биотопов с различным антропогенным воздействием // Вестник Пермского университета. Серия: биология. – 2020. – № 4. – С. 321–333.
2. Parales R.E., Resnick S.M. Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. In: *Pseudomonas* / eds Ramos J.L., Levesque R.C. – Boston: Springer, 2006. – P. 287–340.
4. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinichydrocarbons // *Develop. Ind. Microbiol.* 1961. V. 2. – № 1. – P. 23–32.
5. Baggi G., Bernasconi S., Zangrossi M., Cavalca L., Vincenza A. Co-metabolism of di- and trichlorobenzoates in a 2-chlorobenzoate-degrading bacterial culture: Effect of the position and number of halo-substituents // *International Biodeterioration and Biodegradation.* – 2008. – V. 62. – № 1. – P. 57–64.

ЭНЕРГИИ ЗЕМЛИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА

Рогозин М.В.¹ Михалев В.В.²

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Компания ООО «АНДИ», Пермь, Россия

Ключевые слова: геодинамические активные зоны, растительность, кольцевые структуры.

В связи с тем, что классические методы исследований объясняли рост деревьев факторами генетики и конкуренции лишь на 40 %, а влияние других количественно неизвестно [1] мы использовали методы «лесной биогеофизики», имеющей большие перспективы в лесоводственных исследованиях [2]. В докладе подведены итоги исследования «малых геоактивных зон» (МГА-зон) в попытке связать неотектонику и её влияние на фитоценозы, с изложением некоторых результатов из нашей монографии [1].

Исследования проводились в государственном природном заповеднике «Вишерский» (Пермский край) и в лесах вблизи г. Пермь. На отметках высот 550–800 м на космоснимках были выявлены кольцевые гео- и фитоструктуры, сформировавшиеся в приповерхностной литосфере на МГА-зонах размером 16–160 м в комбинации с зонами 1, 3 и 8 м. Такие зоны повышают выживаемость деревьев в 39 раз с увеличением объема их стволов до 46% [1].

На первом этапе (2008–2015 гг.) энергии Земли изучали методом биолокации с определением МГА-зон восьми типов с размерами 1–160 м. Оказалось, что самые крупные деревья вырастали на зонах размером 1 и 3 м, которые встречались с частотой до 250 шт./га.

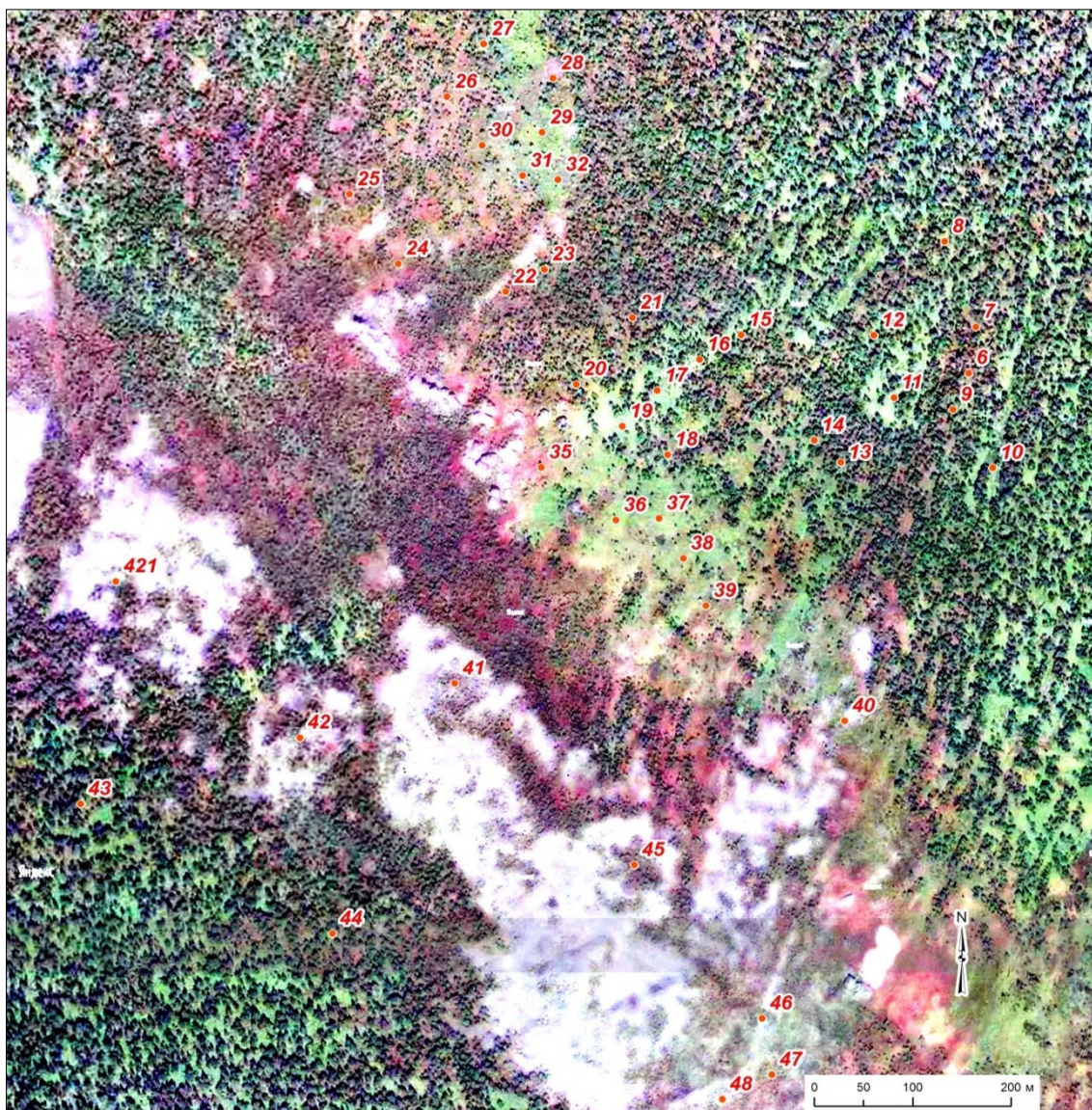
Такие деревья использовали как фитоиндикаторы для проверки применяемого метода. На втором этапе (2016–2018 гг.) выявлялись геодинамические активные зоны [3] на основе линеamentного и морфоструктурного анализа обширных территорий. Учёт плотности линеamentов позволил впервые обнаружить их связь с резким увеличением плеч миграции МГА-зон [1, с. 9]. Также было выяснено, что в лесном питомнике в условиях холодной весны на МГА-зонах всхожесть семян ели увеличилась в 7 раз и поэтому они вполне могут быть использованы для выращивания посадочного материала при изменениях климата. По-видимому, лесные породы эволюционировали с использованием энергий МГА-зон. По крайней мере, буквально все изученные виды деревьев увеличивали на них долголетие, размеры, семеношение и даже меняли наследуемость по интенсивности роста с положительной на отрицательную (!) в зависимости от типов зон [1, с. 17].

На третьем этапе (с 2019 г. и по настоящее время) применили геоструктурометрический анализ (ГСМА) территорий. Инновационная технология ГСМА была разработана на основе научного открытия Ю. И. Фивенского «Малые кольцевые структуры (МКС) рыхлых отложений земной коры», в котором «...экспериментально выявлены неизвестные ранее множественные, со сплошным покрытием земной поверхности, кольцевые природные образования малого размера, создаваемые естественным излучением планеты и проявляющиеся в рыхлых отложениях земной коры на фоне сейсмоакустических волн» [4]. На 1 км² суши их может быть до 6–10 тысяч с размерами десятки – сотни метров и более. Идеальные по форме МКС не встречаются из-за осложняющих их рисунок колец более мелкого ранга. Впервые их удалось выявить после наблюдений за снежным покровом по космоснимкам. Было замечено, что при таянии снега на полях земля освобождается от снега неравномерно кольцами и полукольцами. Микросейсмы встряхивают снег в кольцах за зиму примерно миллион раз. Снег становится плотнее, сходит позднее и лучше насыщает почву водой подобно тому, как снег на лыжном следе тает медленнее. На них летом видны различия в тоне окраски агрокультур, т.е. МКС влияют на их рост и продуктивность [4].

На наш взгляд, в этом случае Землю можно представить, как энергетически живой мега-организм, «сердце» которого пульсирует с частотой 6–10 ударов в минуту и его удары (микросейсмы) встряхивают поверхность Земли. На основе ГСМА в Пермском крае выявлено более сотни крупных кольцевых структур, подобных МКС Ю. И. Фивенского. В заповеднике «Вишерский» нами была отдешифрирована Лыпинская кольцевая мегаструктура размером 100×200 км с контурами, выходящими за пределы Пермского края. Её центр расположен вблизи места, где когда-то нашли первый алмаз на р. Вишера. Наши исследования попадали в её северо-восточный сектор.

Существует также и другой класс кольцевых структур, очень похожих на МКС Ю. И. Фивенского. В них происходит дегазация водорода из недр Земли, что вызывает земные катастрофы. Источником потоков глубинного водорода является жидкое ядро Земли. Выделение водорода приводит к разрушению озонового слоя в стратосфере, и такие места в России в 1991–2000 гг. занимали до 20 % территории. Они приурочены к пересечениям разломов, магматическим массивам и другим геоструктурам [5]. Такие кольцевые депрессии размером до 150 м, где иногда ощущается запах сероводорода, мы обнаружили на одном из болот вблизи г. Краснокамск и в меандре долины р. Кама в Кировском районе г. Пермь.

Начиная с 2020 г. мы начали изучение кольцевых структур в заповеднике «Вишерский». Их выявление осуществлялось на космоснимках по прогалинам, цепочкам деревьев и скальным обнажениям. На рисунке обозначены их центры, так как прорисовка всего кольца закрывала бы опознающие его изменения в фототоне (рис.).



Кольцевые структуры в северной части г. Муни́н-Тумп. Координаты кольца № 27: 59° 12' 17'' в.д., 61° 29' 15'' с.ш., для кольца № 44: 59° 12' 04,5'' в. д; 61° 28' 45'' с.ш.

На рисунке показан северный склон г. Муни́н-Тумп. Гольцы на этом космоснимке представлены светлым фототоном, и в центре они выстраиваются в виде дуги, по которой опознается кольцевая структура диаметром 530 м; она продолжается по деревьям у точек 17, 16 и 15 и далее изгибается на север. Разрешение снимка позволяет опознавать структуры размером от 30 м, которые выстраиваются вокруг точек 13, 14, 25, 26, 27, 31. Биолокация этих структур показала, что они образуются на МГА-зонах с размерами 32, 55, 76 и 110 м. Как правило, центры таких кольцевых образований не заняты деревьями и кустарниками. Это очень похоже на ингибирование роста растений, уже нам известное [1, с. 174].

Изучение кольцевых структур растений показало, что они возникают на «старших» МГА-зонах размером 16–110 м, когда в их кольцо комфорта встраиваются сети из «младших» МГА-зон с размерами 1, 3 и 8 м. На них плотно растут кустарники, деревья и некоторые виды многолетних растений. Сети «младших» зон имеют ячейки от 5–7 до 14–20 м, и они меняют ориентацию вблизи разломов разного генезиса [1, с. 90–95]. Это как раз и объясняет неполное размещение растений по внешнему кольцу «старших» зон.

По-видимому, обнаруженные нами МГА-зоны – это особый класс глубинных энергий Земли, физическую природу которых мы пока не знаем, так как существует проблема регистрации слабых микросейсмоманнитных сигналов. Это непростая задача, поскольку их получение осложнено помехами. Типичные помехи – сигнал геомагнитного поля Земли, низкочастотные колебания магнитосферы, микрофонный эффект [6].

Таким образом, можно полагать, что истечение энергий Земли по малым геоактивным зонам происходит уже миллионы лет, и они скрепляют горные породы, препятствуя их разрушению, а у растений способствует их лучшей выживаемости и росту. Так как в микросейсмоманнитных исследованиях существует проблема сильных помех, то фито- и биоиндикация таких зон остаются пока более эффективными методами их изучения.

Список цитируемой литературы

1. Рогозин М. В., Михалев В. В., Рыбальченко А. Я. Лесные экосистемы и факторы неотектоники. [Электронный ресурс]. Пермь: ПГНИУ, 2020. 249 с.
2. Тихонова И. В. Четыре опоры к фундаменту современного устойчивого лесоводства // Лесные экосистемы: современные вызовы, состояние, продуктивность и устойчивость. Материалы междунар. научно-практ. конф., посвященной 90-летию Института леса НАН Беларуси (Гомель, 13–5 ноября 2020 г.). Гомель: Ин-т леса НАН Беларуси. 2020. С. 97–101.
3. Копылов И. С. Линеаментно-геодинамический анализ Пермского Урала и Приуралья // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. С. 616–624.
4. Фивенский Ю. И. Использование материалов аэрокосмических съёмок для изучения земной коры // Геодезия и картография. 2006. №1. С. 44–52.
6. Сывороткин В. Л. Глубинная дегазация Земли и геоэкологические проблемы приграничных территорий России // Электронное научное издание Альманах Пространство и Время. 2013. Т. 3. Вып. 1. С. 15.
7. Гульельми А. В. Ультранизкочастотные электромагнитные волны в коре и в магнитосфере Земли // Успехи физических наук. 2007. Том 177. № 12. С. 1257–1276.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РИЦИНОВОГО-В-ЛЕКТИНА LdRBLk У КОЛОРАДСКОГО ЖУКА И АНАЛИЗ ЕГО ЭКСПРЕССИИ В ОТВЕТ НА ГРИБНУЮ ИНФЕКЦИЮ

Рощая У.Н., Крюков В.Ю., Косман Е.С., Тюрин М.В. Глулов В.В.

Институт Систематики и Экологии Животных СО РАН, Новосибирск, Россия

Ключевые слова: антигрибной пептид, лектин С-типа, Аттацин, белок теплового шока, *Leptinotarsa decemlineata*.

Лектины С-типа (CTL) представляют собой большой класс Ca^{2+} -зависимых лектинов с различными функциями; в частности, эти белки участвуют в иммунных ответах растений и животных [1]. CTL были охарактеризованы у насекомых разных отрядов, в частности у Чешуекрылые, двукрылые, жесткокрылые и перепончатокрылые [2–5]. У видов чешуекрылых (*Bombyx mori*, *Hyphantria cunea* и *Manduca sexta*), способность CTL участвовать в иммунном ответе изучалась по следующим механизмам: распознавание бактериального липополисахарида дрожжей [6–8], агглютинация бактерий и дрожжей в присутствии ионов Ca^{2+} [9,10] и индукции фенолоксидазного каскада [11–13].

Широкий класс CTL включает белки с рицин-В-лектиновыми доменами (RBL), которые были впервые обнаружены как одна из субъединиц токсина Рицина у клещевины (*Ricinus communis*) [14]. Из-за специфического сворачивания третичной структуры этого домена его полное название – трехлистный лектиновый домен рицинового типа (pfam00652) [15]. В настоящее время в базах данных GenBank NCBI зарегистрировано более 1400 последовательностей этого лектина для бактерий, грибов, растений и насекомых (отряды Coleoptera и Blattodea). Этот домен также присутствует у колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (секвенирование генома BioProject *L. decemlineata* RefSeq, PRJNA420356, 2017), экономически значимого вида, который считается основным вредителем, поражающим посевы картофеля. У жесткокрылых пептиды RBL обычно представлены несколькими ортологами у одного вида. Например, у колорадского жука встречается в четырёх экземплярах (ген банк NCBI: XP_023029739.1, XP_023025121.1, XP_023029750.1 и XP_023029736.1).

Мы предположили, что пептид, содержащий домен RBL (LdRBLk), обнаруженный в транскриптом *L. decemlineata*, может играть роль в иммунном ответе насекомых, аналогичном таковому у CTL. Другими словами, RBL могут распознавать и связывать углеводы клеточных стенок грибов и бактерии и оказывают угнетающее (возможно токсическое) действие на микроорганизмы.

В настоящей работе, чтобы понять, имеет ли исследуемый пептид LdRBLk способность участвовать в иммунных процессах, мы проанализировали его белковую структуру. Был проведен филогенетический анализ аминокислотной последовательности LdRBLk для выяснения его связь с другими пептидами RBL, обнаруженными у *L. decemlineata*, у других насекомых и у других организмов. Далее с помощью кПЦР мы проанализировали влияние грибковой инфекции на экспрессию гена *LdRBLk* в тканях личинок IV. Мы исследовали воздействие грибной инфекции двух разных аскомицетов: *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae) и *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae). А также разную восприимчивостью к грибковой инфекции разных личиночных стадии. Мы также сравнили экспрессию гена *LdRBLk* при различных повреждениях кутикулы и грибковых инфекциях. Чтобы понять взаимосвязь между экспрессией гена *LdRBLk* и экспрессией других генов, связанных с иммунитетом и стрессом, мы изучили экспрессию белка теплового шока HSP90 (фолдинговый белок), который можно рассматривать как маркер стресса [23], и экспрессию антимикробного пептида Аттацина, действующего против грамотрицательных бактерий [24]. Чтобы проверить влияние RBL на рост грибных конидий, мы провели тесты *in vitro* по влиянию коммерчески доступного RBL *R. communis* на прорастание конидий *M. robertsii* и *B. bassiana* на искусственной среде.

Было показано, что уровни экспрессии гена *LdRBLk* в кутикуле *L. decemlineata* и жировом теле увеличились в ответ на обе грибные инфекции. Индукция экспрессии гена *LdRBLk* зависела от восприимчивости личинок к грибам, то есть она значительно возростала у личинок в начале IV возраста, а в конце IV возраста имела лишь тенденцию к увеличению. Усиление экспрессии гена *LdRBLk* также наблюдалась в ответ на другие стрессы, особенно при термических ожогах. Увеличение экспрессии гена *LdRBLk* часто коррелировало с увеличением экспрессией гена антимикробного пептида Аттацина, но не коррелировало с изменением экспрессии гена *hsp90*. Коммерчески доступный В-лектин из токсина Рицин *R. communis* подавлял прорастание конидий грибов на искусственной среде. Мы предполагаем, что LdRBLk участвует в противогрибковых иммунных реакциях у колорадского жука, либо непосредственно проявляя фунгицидные свойства, либо действуя как модулятор иммунного ответа [16].

Работа поддержана грантом РФФИ №19-14-00138

Список цитируемой литературы

1. Drickamer, K. C-type lectin-like domains // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1999. – V.5. – P.585–590.

2. Rao, X.J., Shahzad, T., Liu, S., Wu, P., He, Y.T., Sun, W.J., Fan, X.Y., Yang, Y.F., Shi, Q., Yu, X.Q. Identification of C-type lectin-domain proteins (CTLDPs) in silkworm *Bombyx mori* // *Dev. Comp. Immunol.* – 2015. – №.53. – P.328–338.
3. Bi, J., Ning, M., Li, J., Zhang, P., Wang, L., Xu, S., Zhong, Y., Wang, Z., Song, Q., Li, B. A C-type lectin with dual-CRD from *Tribolium castaneum* is induced in response to bacterial challenge // *Pest. Manag. Sci.* – 2020. – №.76. – P.3965–3974.
4. Lua, Y., Sua, F., Zhua, K., Zhua, M., Lia, Q., Hua, Q., Zhanga, J., Zhanga, R., Yu, X.-Q. Comparative genomic analysis of C-type lectin-domain genes in seven holometabolous insect species // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2020. – №.126. – P.103451.
5. Jiang, H., Vilcinskas, A., Kanost, M.R. Immunity in Lepidopteran Insects. In *Invertebrate Immunity, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Söderhäll, K., Ed., Springer: Boston, MA, USA. – 2010. – P.181–204.
6. Koizumi, N., Imai, Y., Morozumi, A., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H., Sato, R. Lipopolysaccharide-binding protein of *Bombyx mori* participates in a hemocyte-mediated defense reaction against Gram-negative bacteria // *J. Insect Physiol.* – 1999. – №.45. – P.853–859.
8. Shin, S.W., Park, D.S., Kim, S.C., Park, H.Y. Two carbohydrate recognition domains of *Hyphantria cunea* lectin bind to bacterial lipopolysaccharides through O-specific chain // *FEBS Lett.* – 2000. – №.467. – P.70–74.
9. Yu, X.Q., Ling, E., Tracy, M.E., Zhu, Y. Immulectin-4 from the tobacco hornworm *Manduca sexta* binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid // *Insect Mol. Biol.* – 2006. – №.15. – P.119–128.
10. Yu, X.Q., Tracy, M.E., Ling, E., Scholz, F.R., Trenczek, T. A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2005. – №.35. – P.285–295.
11. Watanabe, A., Miyazawa, S., Kitami, M., Tabunoki, H., Ueda, K., Sato, R. Characterization of a novel C-type lectin, *Bombyx mori* multibinding protein, from the *B. mori* hemolymph // *J. Immunol.* – 2006. – №.177. – P.4594–4604.
12. Yu, X.Q., Gan, H., Kanost, M.R. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 1999. – №.29. – P.585–597.

АНАЛИЗ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ АЛАРМОН СИНТЕТАЗЫ МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНГИБИТОРА ПЕРСИСТЕНЦИИ

Сидоров Р.Ю.^{1,2}, Ткаченко А.Г.^{1,2}

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

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: антибиотики, персистенция, микобактерии, (p)ppGpp

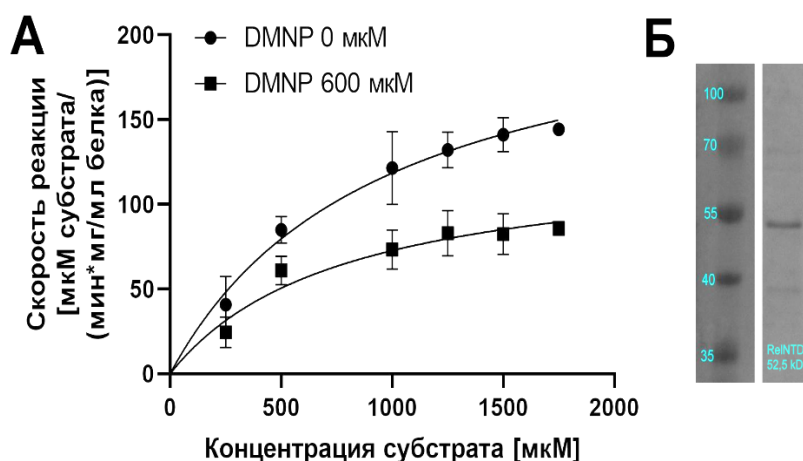
Туберкулез является наиболее частой причиной смерти от инфекционных заболеваний в мире [1]. Основные трудности при лечении туберкулеза возникают вследствие высокого числа случаев множественной лекарственной устойчивости и большой доли рецидивов инфекции. В основе этих проблем лежат механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам: резистентность и персистенция [2].

Резистентность связана с низкой эффективностью лечения инфекции на ранней фазе интенсивной терапии туберкулеза и приводит к невозможности использования препаратов первой линии. В некоторых случаях возникает штамм туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью, который может оставлять пациентов и без более эффективных препаратов второй линии [1]. Персистенция возникает в результате склонности микобактерий к существованию в дормантной форме и приводит к рецидивам инфекции и затяжной фазе продолжения лечения. В дормантной форме метаболические процессы в клетках бактерий замедляются или останавливаются, поэтому классические антибиотики, действующие на молекулярные мишени в активно растущих клетках, оказываются неэффективны в поздней фазе терапии [3]. Таким образом, существует необходимость в новых стратегиях лечения, призванных решить проблемы резистентности и персистенции. Одним из возможных вариантов могут быть новые антибиотики, воздействующие на процессы адаптации бактерий к стрессу, которые формируют дормантные состояния [4].

Соединением, обладающим свойствами подавления персистенции, является DMNP, синтетический аналог природного соединения эрогоргиана. Ранее мы показали способность DMNP подавлять алармон синтетазы микобактерий [5, 6]. Белки алармон синтетазы синтезируют алармоны (p)ppGpp, сигнальные молекулы стресса бактерий, которые первоначально описаны в связи со стринджент-ответом бактерий, но, кроме того, ответственны за формирование персистенции и биопленок у бактерий. Алармон синтетазы не встречаются в эукариотических клетках, а микобактерии без (p)ppGpp имеют сниженную долговременную выживаемость внутри хозяина и нарушение целостности биопленок, что делает эти ферменты перспективными кандидатами для мишеней нового класса антибиотиков [7].

В данном фрагменте исследований мы использовали (p)ppGpp-синтетазу/гидролазу Rel_{Msm} из *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Чтобы локализовать сайт связывания DMNP и получить увеличенный уровень активности, мы использовали усеченную версию Rel_{Msm} – RelNTD, ранее описанную в литературе [8], в которой удален С-терминальный регуляторный домен, но сохраняются N-терминальные гидролазный и синтетазный домены. Для наработки белка мы использовали плазмиду pET23b, обеспечивающую сверхэкспрессию белка в *Escherichia coli*, и клонировали в нее последовательность ДНК, кодирующую RelNTD, под контроль T7-промотора в виде слияния с С-терминальным HisTag. При получении и клонировании вставки мы использовали: содержащие сайты рестрикции праймеры к гену Rel_{Msm}, высокоточную полимеразу, рестриктазы NdeI и HindIII и T4 ДНК-лигазу. Последовательность вставки была секвенирована для проверки соответствия последовательности ДНК ожидаемой. Экспрессия белка была проведена в штамме *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET23b-relNTD (2 часа культивирования при 37°C, 4 часа при 30°C), после чего проведена экстракция белка ультразвуком и очистка белка при помощи Ni²⁺-аффинной хроматографии (HisPur Ni-NTA Purification Kit). Анализ очищенного белка проведен при помощи электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS (Рисунок 1Б), а концентрация оценена спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Ферментативная реакция проводилась в условиях, описанных ранее [6]. Оценка изменения концентрации субстрата проводилась при помощи обращённо-фазовой ВЭЖХ с ацетонитрилом и фосфатом калия в качестве подвижной фазы с детекцией при 254 нм [9]. Алармон синтетазы способны катализировать реакцию ГТФ+АТФ→pppGpp+АМФ. Скорость реакции определялась как убывание концентрации субстрата ГТФ в мкМ за минуту реакции на концентрацию белка в мг/мл. Построение кривой функции по уравнению Михаэлиса-Ментен производилось при помощи нелинейной регрессии в GraphPad Prism 8.0.

Исследования ферментативной кинетики позволяют определить тип ингибирования, свойственный изучаемому соединению. Мы проанализировали активность N-терминального домена белка Rel_{Msm} из *M. smegmatis* при диапазоне концентраций субстрата ГТФ (250–1750 мкМ) в присутствии (600 мкМ) или без ингибитора DMNP (Рисунок, А).



Ферментативная кинетика RelNTD. (А) Зависимость скорости реакции по убыванию субстрата от концентрации субстрата ГТФ в присутствии ингибитора DMNP или без него. Графики функции построены посредством нелинейной регрессии согласно модели Михаэлиса-Ментен. (Б) Белок RelNTD на электрофореze в полиакриламидном геле в присутствии SDS. Ожидаемый молекулярный вес RelNTD 52,5 kDa рассчитан по аминокислотной последовательности при помощи инструмента ProtParam

То, что DMNP способен к ингибированию N-терминального домена белка Rel_{Msm}, локализует предполагаемое место связывания в области синтетазного или гидролазного доменов Rel_{Msm}, но не в области регуляторного домена, что согласуется с нашими предыдущими исследованиями [5]. При помощи метода нелинейной регрессии мы построили кривую Михаэлиса-Ментен и определили параметры функции V_{max} и K_m (Таблица).

V_{max} и K_m, полученные методом нелинейной регрессии в зависимости от DMNP.

Данные приведены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего

RelNTD vs ГТФ	V _{max} [мкМ/(мин*мг/мл)]	K _m [мкМ]	Rsqr
DMNP 0 мкМ	231±28	952±251	0,8951
DMNP 600 мкМ	130±19	783±276	0,8211

Максимальная скорость реакции V_{max} имеет статистически значимое различие (р-значение=0.0058) в присутствии и без ингибитора DMNP, в то время как константа Михаэлиса K_m не имеет значимых различий (р-значение=0.6529), что означает, что DMNP свойственен неконкурентный (noncompetitive) тип ингибирования, то есть DMNP не конкурирует с субстратами ГТФ и АТФ за сайт связывания в синтетическом домене. Ранее в научных публикациях описывались ингибиторы (p)ppGpp-синтаз только с конкурентным [4, 10] или смешанным [4] типами ингибирования.

Разработка новых лекарственных средств является ключевым аспектом в борьбе с туберкулезом. В последнее десятилетие появляются противотуберкулезные препараты (бедаквилин, деламаид) с новыми механизмами действия, направленные на борьбу с множественной лекарственной устойчивостью. Хотя новый механизм антибактериального действия позволяет преодолеть резистентность, такое решение может быть временным, если не разработать средства для уменьшения продолжительности лечения и борьбы с латентным туберкулезом в поздней фазе. Антибактериальные средства, направленные на борьбу с персисторными клетками и биопленками, такие как DMNP, потенциально могут стать решением данных проблем.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-73-10156.

Список цитируемой литературы

1. Всемирная Организация Здравоохранения – Туберкулез: Основные факты. – Веб-сайт (дата публикации: 14 октября 2020 г.).
2. Mandal S., Njikan S., Kumar A. et al. The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery // *Microbiology*. – 2019. – No 165(5) – P. 492–499.
3. Salcedo-Sora J. E., Kell D.B. A Quantitative Survey of Bacterial Persistence in the Presence of Antibiotics: Towards Antipersisters Antimicrobial Discovery // *Antibiotics*. – 2020. – 9, 508.
4. Syal K., Flentie K., Bhardwaj N. et al. Synthetic (p)ppGpp analogue is an inhibitor of stringent response in mycobacteria // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2017. – V. 61. – No 6. – P. 1–14.
5. Сидоров Р.Ю., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г. Симбиоз-Россия 2020. Молекулярный докинг синтетического аналога природного соединения эрогоргина, ингибитора микобактериальной персистенции // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием (Пермь). – 2020. – С. 236-241.
6. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Yu. et al. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases // *Chem Biol*. – 2021. – PMID: 33621482.
7. Kushwaha G.S., Oyeyemi B.F., Bhavesh N.S. Stringent response protein as a potential target to intervene persistent bacterial infection // *Biochimie*. – 2019. – No 165. – P. 67-75.
8. Jain V., Saleem-Batcha R., China A., Chatterji D. Molecular dissection of the mycobacterial stringent response protein Rel // *Protein Sci*. – 2006. – V. 15(6). – P. 1449-64.
9. Akhova A.V., Tkachenko A.G. HPLC–UV Method for Simultaneous Determination of Adenosine Triphosphate and Its Metabolites in Mycobacterium smegmatis // *Acta Chromatographica*. – 2019. – V. 31(1). – P. 45–48.
10. Syal K., Bhardwaj N., Chatterji D. Vitamin C targets (p)ppGpp synthesis leading to stalling of long-term survival and biofilm formation in Mycobacterium smegmatis // *FEMS Microbiology*

ОСОБЕННОСТИ БИОДЕСТРУКЦИИ ИБУПРОФЕНА КЛЕТКАМИ *RHODOCOCCUS CERASTII* ИЭГМ 1243

Субботина М.В.¹, Бажутин Г.А.^{1,2}, Ившина И.Б.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

Ключевые слова: НПВС, ибупрофен, биodeградация, *Rhodococcus*

Развитие системы здравоохранения влечёт закономерные последствия: появление широкого ассортимента и возрастание объёма производства лекарственных средств на рынке. Всё это приводит к нерегулируемому потреблению лекарств населением [1,2]. Увеличение объёмов производства и потребления лекарственных средств стало причиной новой экологической проблемы мирового масштаба – медикаментозного загрязнения окружающей среды. Одним из наиболее часто детектируемых в среде фармацевтических загрязнителей является ибупрофен, представляющий собой безрецептурный нестероидный противовоспалительный препарат, широко используемый в медицинской практике [3]. Ибупрофен детектирован в почвах, а также в грунтовых, речных и морских водах по всему миру [3,4]. Следы ибупрофена обнаружены в Антарктиде, которая, казалось бы, недостижима для фармацевтической деятельности человека [5].

Хроническое токсическое действие ибупрофена и его метаболитов на живые организмы провоцирует появление нарушений общей продуктивности позвоночных животных [6–8]. В связи с этим актуальны исследования по поиску эффективных и экологически безопасных способов нейтрализации данного фармполлютанта.

Объектом для настоящих исследований был выбран штамм *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243, поскольку в наших ранних работах отмечена наибольшая эффективность биодеструкции ибупрофена с использованием данного штамма [9]. Цель работы заключалась в изучении влияния процесса биодеструкции ибупрофена на морфофизиологические и метаболические показатели клеток *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243.

В экспериментах по биодеструкции использовалась минерально-солевая среда определенного состава, в которую ибупрофен вносили в концентрации 0,1 г/л. В качестве дополнительных источников углерода и энергии использовали *n*-гексадекан или D-глюкозу (0,1%). В качестве инокулята использовали суспендированные в физиологическом растворе бактериальные клетки (OD_{600} 0,2), предварительно выращенные в течение 1, 2, 3 или 4 сут в NB (Oxoid, UK) и отмытые дважды фосфатным буфером (pH 7,0). Во всех опытах применяли контроль абиотической деструкции ибупрофена и биотический контроль. Убыль ибупрофена в процессе биодеструкции регистрировалась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метаболическую активность родококков изучали методом высокочувствительной респирометрии. Морфометрические изменения клеток под воздействием ибупрофена выявляли с помощью атомно-силовой микроскопии. Проницаемость мембран контролировали за счет окрашивания клеток кристаллическим фиолетовым, а для визуализации клеточных липидов применяли флуоресцентный краситель нильский красный (Nile Red).

В результате проведенных экспериментов выявлено, что биодеструкция ибупрофена клетками *R. cerastii* ИЭГМ 1243 на 8-е сут эксперимента составила 85,9 и 69,4% в присутствии глюкозы и *n*-гексадекана соответственно. В присутствии ибупрофена наблюдалось возрастание общего количества выделенного углекислого газа и уменьшение интенсивности поглощения кислорода по сравнению с контрольными вариантами. Данные, полученные при измерении интенсивности газообмена бактериальных клеток, являются подтверждением того, что использование глюкозы в качестве дополнительного энергетического субстрата способствовало повышению функциональной активности родококков в отношении ибупрофена. В одновременном присутствии в среде *n*-гексадекана и ибупрофена была обнаружена выраженная аккумуляция липидных включений: около 20% клеток содержали значительное число липидных включений, тогда как в биотическом контроле – только 7% клеток, что, по-видимому, указывает на индукцию окислительного стресса бактерий [10]. По нашим данным, присутствие ибупрофена стимулировало достоверное увеличение средних размеров бактериальных клеток, но при этом не оказывало влияния на проницаемость мембран и шероховатость клеточной поверхности. Выявленные морфологические изменения родококков можно рассматривать как один из механизмов адаптации родококков к воздействию экотоксиканта.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-14-00132, <https://rscf.ru/project/21-14-00132/>

Список цитируемой литературы

1. Гетьман М.А., Наркевич И.А. Прогнозирование и контроль поступления остатков ЛС в окружающую среду // Ремедиум. – 2013. – № 5. – С. 36–43.
2. Ziyhan A., Ince N.H. The occurrence and fate of antiinflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and nonconventional processes // J. Haz. Mat. – 2011. – V. 187. – P. 24–36.

3. aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Küster A. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives // Environ. Toxicol. Chem. – 2016. – V. 35. – P. 823–835.
4. Ogunwale A.G., Saliu J.K. Seasonal occurrence of Ibuprofen in sediment, water, and biota in river Owena and Ogbese, and its ecological risk assessment // Anal. Sci. Technol. – 2020. – V. 5. – P. 1–10.
5. González-Alonso S., Merino L.M., Esteban S., López de Alda M., Barceló D., Durán J.J. 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.
6. Hallare A.V., Köhler H.R., Triebskorn R. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO // Chemosphere. – 2004. – V. 56. – P. 659–666.
7. Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. Toxic effects of the non-steroidal antiinflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout // Aquat. Toxicol. – 2004. – V. 68. – P. 141–150.
8. Zorrilla I., Martinez R., Taggart M.A., Richards N. Suspected flunixin poisoning of a wild eurasian griffon vulture from Spain // Conserv. Biol. – 2015. – V. 29. – P. 587–592.
9. Бажутин Г.А., Тюмина Е.А., Ившина И.Б. Биотрансформация ибупрофена клетками *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых учёных-биологов с международным участием, Пермь, 2020. – С. 42–47.
10. Alvarez H.M., Steinbüchel A. Physiology, biochemistry, and molecular biology of triacylglycerol accumulation by *Rhodococcus* // In: H.M. Alvarez (td.). Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs 16. Springer Nature. Switzerland AG. – 2010. – P. 263–290.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

Сутормина Л.В.², Самойлова З.Ю.¹, Смирнова Г.В.¹

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

²Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: бактериальная пленка, Левзея сафлоровидная, *Escherichia coli*

Организм сельскохозяйственных животных находится под постоянным воздействием самых разнообразных факторов внешней среды, которые способны оказывать влияние на жизнеспособность и продуктивность животных. Среди этих факторов важное значение имеет качество кормов. Использование кормовых растений, обогащенных витаминами, полифенолами и другими биологически активными веществами – одно из направлений в современном животноводстве. Выбор кормовых добавок зависит от их способности стимулировать пищеварительные процессы, улучшая усвояемость корма, а также повышать устойчивость к различным инфекционным заболеваниям, вызываемых патогенной микрофлорой в организме животного. В литературе отмечается положительное влияние полифенолов на живой организм. В значительной степени такой эффект достигается за счет взаимодействия с микробиотой организма-хозяина [1].

Многочисленные исследования в области микробиологии свидетельствуют о том, что в отличие от одиночных планктонных клеток, значительная часть микроорганизмов существует в виде ассоциаций, погруженных в матрикс, называемых биопленками. Биопленки распространены практически во всех экосистемах, в том числе и в живых организмах.

Они могут быть сформированы бактериями, принадлежащих к одному или разным видам [2]. Биопленки в кишечнике организма-хозяина могут играть как положительную роль в виде бактерий-комменсалов, так и вызывать негативное воздействие при инфицировании патогенными микроорганизмами.

Накоплены данные свидетельствуют о том, что многие биологически активные соединения действуют на «чувство кворума» (quorum sensing) бактерий, способность к адгезии, поверхностные свойства клеток, подвижность и экспрессию генов, участвующих в биопленкообразовании и т. д. [3]. Также известно, что растительные метаболиты могут определять характер растительно-микробных взаимодействий и способны оказывать ингибирующий или стимулирующий эффект как на отдельные клетки бактерий, так и на бактериальные сообщества. В связи с этим, изучение воздействия БАВ растительного происхождения на биопленки может способствовать направленному улучшению качества кормов в животноводстве. Среди БАВ растительного происхождения наибольшее значение имеют полифенолы.

Одним из растительных источников полифенолов является Левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*), также известная, как Большеголовик сафлоровидный, Стемаканта, которая представляет собой многолетнее травянистое растение рода Рапотникум, семейства Астровых. Распространена в горах Алтая, в Западной и Восточной Сибири и Средней Азии. Выявлены антиоксидантные, антирадикальные и иммуностимулирующие свойства левзеи.

Целью исследования являлось изучение влияния экстракта левзеи сафлоровидной на биопленкообразование у бактерий *Escherichia coli* BW25113. Благодаря хорошо изученным физиолого-биохимическим и генетическим свойствам эти бактерии являются удобными тест-системами для изучения влияния БАВ на процессы биопленкообразования.

Водно-спиртовой экстракт левзеи сафлоровидной был получен из надземной части растений, собранных в фазе бутонизации и начала цветения на опытном участке Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства ПФИЦ УрО РАН. Культуру *E. coli* выращивали в термостате при 37°C на минимальной среде М9 с добавлением глюкозы (4 г/л). После центрифугирования клетки ресуспендировали в свежей среде. В качестве растворителя для экстракта был выбран диметилсульфоксид (ДМСО).

Полученную культуру и по 5 мкл экстракта или ДМСО переносили в 96-луночные полистирольные планшеты (конечный объем в лунке 200 мкл) и далее инкубировали в статических условиях при 37°C в течение 22 часов. Количество образовавшихся биопленок определяли путем окрашивания клеток генцианвиолетом [4]. Используя планшетный спектрофотометр xMark™ (Bio-Rad), измеряли рост клеток по показателю оптической плотности при длине волны 600 нм (OD₆₀₀), а также величину валового и удельного биопленкообразования (SBF) при длине волны 540 нм (OD₅₄₀) через 22 часа инкубации.

Была проведена оценка влияния исследуемого экстракта в концентрациях 25 мкг/мл, 50 мкг/мл и 100 мкг/мл на биопленкообразование у бактерий *E. coli*. Добавление экстракта оказывало ингибирующий эффект на рост биопленок прямо пропорционально используемой концентрации. При максимальной дозе экстракта (100 мкг/мл) величина удельного биопленкообразования снижалась на 60-70% по сравнению с контролем. ДМСО не оказывал значительного влияния на величину биопленкообразования.

Также изучено влияние экстракта левзеи сафлоровидной на биопленкообразование у бактерий *E. coli* в зависимости от температуры, при которой инкубировали бактерий. Температура является важным экологическим критерием, влияющим на переход бактерий к многоклеточному образу жизни. Известно, что определенная группа генов *E. coli*, связанных с процессом биопленкообразования, экспрессируется более интенсивно при низкой температуре. Максимальные показатели интенсивности биопленкообразования были зафиксированы при температуре 23°C [5]. В наших экспериментах удельное биопленкообразование в культурах, необработанных экстрактами, при более низкой температуре (25°C±2) было выше в 1,5 – 2 раза, чем при 37°C (Рис. 1).

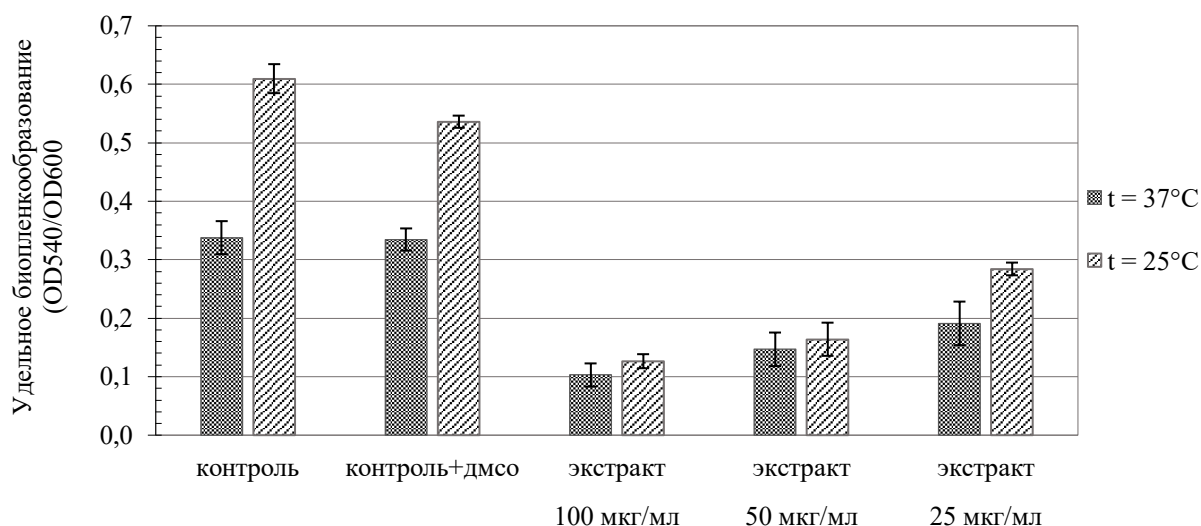


Рисунок 1 – Влияние различных концентраций экстракта и температуры на способность бактерий *E. coli* к формированию биопленок

Величина удельного биопленкообразования при добавлении исследуемых концентраций экстракта незначительно увеличивалась при температуре инкубации 25(±2) °С, по сравнению с 37 °С. Таким образом, температурный фактор не оказывал значительного влияния на ингибирующий эффект экстракта.

Мы также сравнили влияние экстракта левзеи на способность бактерий *E. coli* к формированию биопленок в сравнении с известными антиоксидантами.

Для этой цели были выбраны глутатион и тролокс. Вещества в концентрации 1 ммоль/л вносили в соответствии с методикой, указанной ранее. Результаты представлены на рисунке 2.

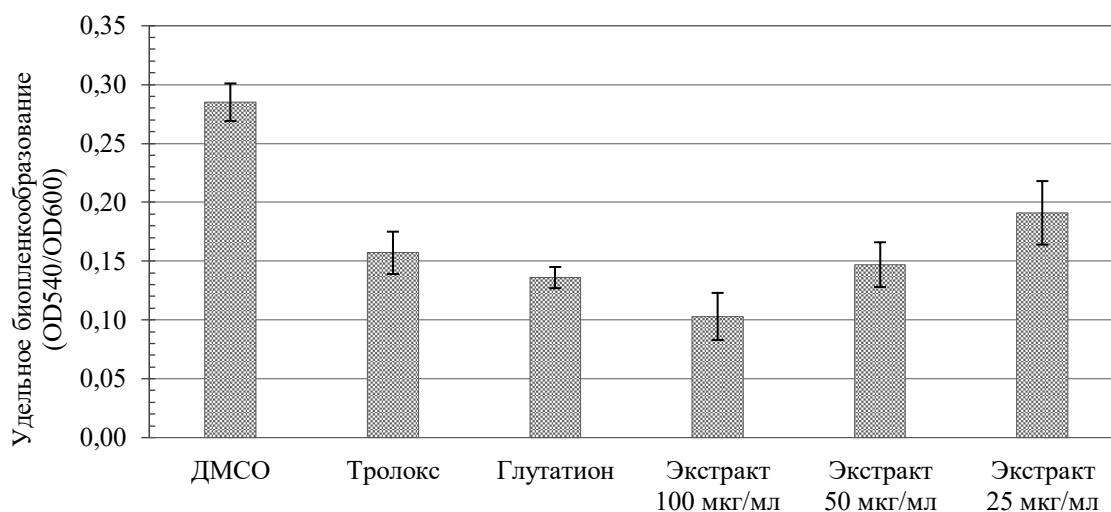


Рисунок 2 – Влияние экстракта левзеи и антиоксидантов глутатиона и тролокса на способность бактерий *E. coli* к формированию биопленок

Обработка культуры и тролоксом, и глутатионом приводила к снижению SBF в 1,5 и 2 раза, соответственно, т.е. примерно также как 50 мкг/мл экстракта. Примечательно, что экстракт в максимальной концентрации 100 мкг/мл заметнее ингибировал биопленкообразования, по сравнению с используемыми антиоксидантами.

Также исследовано влияние экстракта левзеи на зрелые суточные биопленки. Добавление 100 мкг/мл экстракта к зрелым биопленкам не приводило к их дисперсии, напротив,

наблюдался слабый дополнительный прирост массы биопленок в течение последующих суток инкубации.

Полученные в этой работе результаты свидетельствуют о том, что экстракт левзеи сафлоровидной может оказывать ингибирующее влияние на образование биопленок бактериями *E. coli*, но не влиять на ранее сформированные биопленки.

Работа поддержана грантом РФФИ-Урал № 19-44-590009.

Список цитируемой литературы

1. 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. – № 2. – P. 78.
2. Глушанова Н.А., Блинов А.И., Алексеева Н.Б. Бактериальные биопленки в инфекционной патологии человека / // *Медицина в Кузбассе. Клинические и диагностические особенности ведения пациентов, относящихся к контингенту особого внимания.* –2015, с. 30-35.
3. Маркова Ю.А. Растительные метаболиты как регуляторы развития микробных биопленок (обзор) // *Вестник ОГУ №13 (174) //* – 2014. – С. 59-65.
4. Samoilova Z., Muzyka N., Lepekhina E., Oktyabrsky O., Smirnova G. Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in *Escherichia coli* // *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* – 2014. –V. 105. – № 4. – P. 709-722.
5. Christine A. White-Ziegler, Suzin Um, Natalie M. Pérez, Abby L. Berns, Amy J. Malhowski, and Sarah Young. Low temperature (23°C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiol.* – 2008. – V. 154. – P. 148-166.

ТРАНСФОРМАЦИЯ АКРИЛОНИТРИЛА АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА

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

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

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: алкалофилы, галотолерантность, нитрилгидролизующие бактерии

Нитрил – это органическое соединение с функциональной группой $C\equiv N$. Различные нитрилы широко используются в промышленности как самостоятельные, так и промежуточные продукты. Например, в качестве растворителей, для производства полимеров, как интермедиаты в получении лекарственных препаратов, фармацевтические препараты и гербициды. За несколько десятилетий это привело к росту спроса на эффективный катализ, в том числе и ферментативный, и ремедиацию загрязненной нитрилами среды, так как большинство нитрилов обладают высокой токсичностью, мутагенным и канцерогенным действием [1].

В отличие от химического пути, ферментативный гидролиз нитрилов выгоден благодаря селективности, энергетической эффективности и характеристикам "зеленого" катализатора [2].

Однако в промышленности может возникнуть потребность проведения реакции в более жёстких условиях [3]. Таким образом, поиск высоко толерантных производственных штаммов из экстремальных сред и выделение их ферментов становится всё более актуальным для биотехнологии [4]. Большинство опубликованных работ связано с бактериями из естественных источников обитания, тогда как в нашем исследовании рассмотрены микроорганизмы из щелочной высокоминерализованной среды техногенного происхождения.

Объектом исследования явилось содовое шламохранилище АО «Березниковский содовый завод» (Пермский край), среды которого (вода, осадки, грунты) характеризуются высоким pH и/или высокой степенью минерализации.

Цель работы: определить активность ферментов гидролиза нитрилов у галоалкалотолерантных бактерий, изолированных из содового шламохранилища, при культивировании на среде с разным pH и концентрацией хлорида натрия, и в условиях варьирования pH и минерализации реакционной среды.

Бактериальные изоляты были выделены на минеральной среде с 0,25% ацетонитрилом в качестве единственного источника углерода из содового шлама действующего шламохранилища (изолят 5Э) и из грунта старой карты шламохранилища (изолят 6Э), и идентифицированы методом секвенирования гена 16S rPHK как *Rhodococcus qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э соответственно. *R. erythropolis* 6Э и *R. qingshengii* 5Э выращивали на минеральной среде с ацетамидом и сорбитом соответственно в течение 25–37 дней. Концентрация NaCl в среде составляла 0,5 и 50 г/л, pH – 7; 8 и 10. Рост оценивали по изменению оптической плотности среды при λ 540 нм. Нитрилгидролизующую активность определяли при 0,5; 50 г/л NaCl и pH 7; 10.

Оба штамма проявляли максимальную активность в слабощелочных условиях при NaCl 0,5 г/л и pH 8. Для *R. qingshengii* 5Э она достигла 24,4 ммоль/г/ч, а для *R. erythropolis* 6Э 5,6 ммоль/г/ч (рисунок 1). *R. qingshengii* 5Э накапливал максимальное количество биомассы в среде с pH 10, что характеризует его как алкалофил, однако повышение концентрации соли выше 0,5 г/л оказывало ингибирующее воздействие на рост. С другой стороны, *R. erythropolis* 6Э можно назвать галотолерантным, он легче адаптировался к росту с NaCl 50 г/л при pH близком к нейтральному.

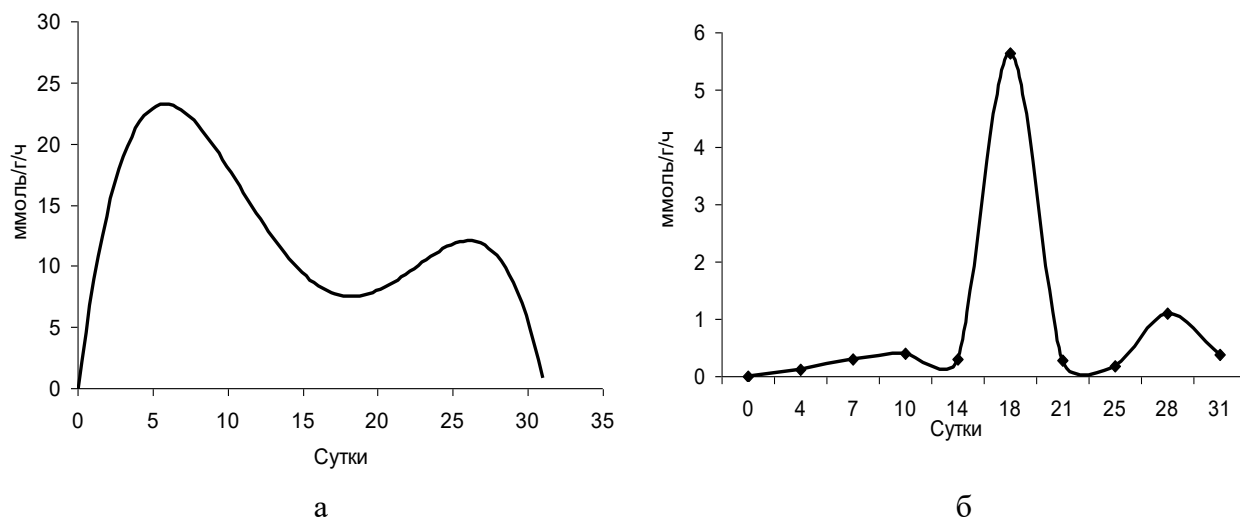


Рисунок 1 – Нитрилгидратазная активность *R. qingshengii* 5Э (а) и *R. erythropolis* 6Э (б) при росте на среде с 0,5 г/л NaCl и pH 8

После культивирования изолятов в физиологических условиях, отмытую от среды культивирования биомассу помещали в реакционную среду с разным pH и концентрациями соли. Переход в "жёсткую" реакционную среду значительно отразился на активности. Установлено, что наибольшая активность нитрилгидратазы *R. qingshengii* 5Э проявлялась при pH 10 и 0,5 г/л соли в реакционной среде и составляла 2,6 ммоль/г/ч, при этом фермент лучше адаптировался к высокой концентрации соли при данном pH. Максимальная активность

нитрилгидратазы *R. erythropolis* 6Э проявлялась при физиологическом рН и 0,5 г/л соли и составила 0,1 ммоль/г/ч, фермент эффективнее адаптировался к 50 г/л NaCl при нейтральном рН (0,06 ммоль/г/ч) (рисунок 2).

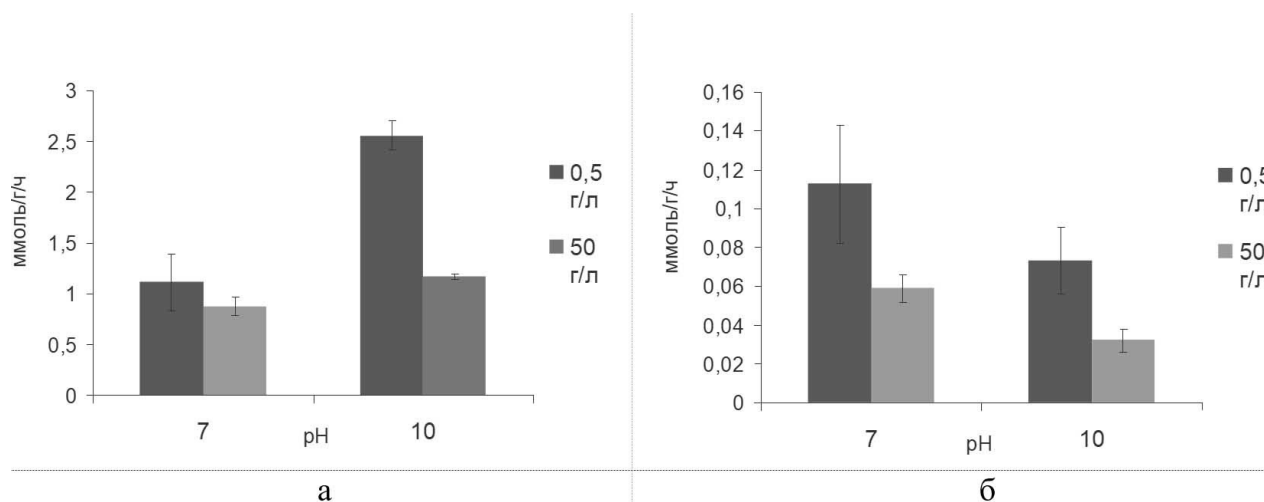


Рисунок 2 – Нитрилгидратазная активность *R. qingshengii* 5Э (а) и *R. erythropolis* 6Э в реакционной среде с соотношением NaCl 0,5;50 г/л и рН 7;10

Таким образом, активность нитрилгидролизующих ферментов в большей степени проявлялась при росте в слабощелочных условиях. При росте в физиологических условиях и постановке реакции с различными рН и концентрациями хлорида натрия *R. qingshengii* 5Э был активен в щелочных условиях, тогда как *R. erythropolis* 6Э в нейтральной среде, оба при 0,5 г/л NaCl. Увеличение концентрации соли до 50 г/л оказывало угнетающее воздействие на активность штаммов, однако каждый из них эффективнее преодолевал эти неблагоприятные условия при "комфортном" для данного штамма, уровне рН. Характерные черты штаммов можно объяснить особенностями среды, из которой они были выделены. *R. qingshengii* 5Э получен из содового шлама (рН 11) действующего шламохранилища, тогда как *R. erythropolis* 6Э получен из грунта старой карты содового шламохранилища с глубины 5 см от поверхности. В последнем случае в почве происходили процессы, связанные с осушением и выведением из эксплуатации шламохранилища. В результате уровень рН снизился до слабощелочного (8–8,5), однако сохранилась высокая концентрация хлорида натрия, особенно на поверхности. Стоит отметить, что низкая активность изолятов может обуславливаться не резкой сменой условий, а недостаточным временем культивирования. Исходя из полученных данных и учитывая показатели динамики роста, можно предварительно охарактеризовать штамм *R. qingshengii* 5Э как алкалофильный, а *R. erythropolis* 6Э как галотолерантный.

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

Список цитируемой литературы

1. Banerjee A., Sharma R., Banerjee U.C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – V. 60. – P. 33–44.
2. Schoemaker H.E., Mink D., Wubbolts M.G. Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis // Science. – 2003. – V. 299. – №. 5613. – P. 1694–1697.
3. Sorokin D.Y., Pelt S., Tourova T.P., Takaichi S., Muyzer G. Acetonitrile degradation under haloalkaline conditions by *Natronocella acetinitrilica* gen. nov., sp. nov. // Microbiology. – 2007. – V. 153. – P. 1157–1164.

4. Морозкина Е.В., Слуцкая Э.С., Фёдорова Т.В., Тугай Т.И., Голубева Л.И., Королёва О.В. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение (обзор) // Прикл. биохим. микробиол. – 2010. – Т. 46. – №1. – С. 5–20.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА У РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ

Сюткина Д.А., Четина О.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: солеотвалы, засоление, минеральное питание

Техногенное засоление ландшафтов таежной зоны в настоящее время является сложной и актуальной проблемой. На территории Пермского края засоление почв обусловлено, прежде всего, добычей солей на Верхнекамском месторождении. При промышленной добыче и переработке солей на поверхность складировются солевые отвалы, ежегодно занимающие более 20-25 га, содержание хлорида натрия в которых составляет более 90%. Вследствие складирования промышленных отходов на поверхности отмечаются очаги вторичного засоления почвенного покрова. Растениям этой зоны необходимо адаптироваться к корневой среде с высокой концентрацией солей [2, 4].

Интенсивное засоление влияет на протекание всех основных физиологических процессов у растений. В засоленных почвах уменьшается доступность макро- и микроэлементов для растений. У одних растений в условиях засоления происходит снижение поглощения корнями определенных минеральных элементов, у других нарушается лишь их использование. Несбалансированное минеральное питание оказывается причиной голода растений, их повышенной восприимчивости к патогенам и вредителям, снижения выживаемости на фоне экстремальных природных и антропогенных факторов [3].

Целью нашего исследования являлось определение содержания засоряющих ионов (Na^+ и Cl^-), кальция и калия в листьях исследуемых растений в условиях техногенного засоления. В качестве объектов исследований были взяты 6 видов растений: бескильница расставленная (*Puccinellia distans* P.), вейник наземный (*Calamagrostis epigeios* L.), лебеда раскидистая (*Atriplex patula* L.), марь сизая (*Chenopodium glaucum* L.), осот полевой (*Sonchus arvensis* L.), ситник жабий (*Juncus bufonius* L.). В листьях исследуемых растений было определено количество Na^+ и K^+ методом пламенной фотометрии, а также Ca^{2+} и Cl^- комплексометрическим и меркурометрическим способом (соответственно).

Проведенные исследования показали, что в исследуемых видах растений больше всего присутствует засоряющих ионов Cl^- . Максимальное количество ионов Cl^- зафиксировано в листьях лебеды (9900 мг/100 г сухой массы), у остальных растений количество варьируется в пределах от 1657-6500 мг/100 г сухой массы (рис.1). Наименьшее содержание ионов Cl^- отмечено у вейника (1657 мг/100 г сухой массы).

Количество ионов натрия в надземных органах варьирует в диапазоне 1100 – 5000 мг/100 г сухой массы (рис. 2). Максимальным содержанием Na^+ так же отличились листья лебеды раскидистой (5043 мг/100 г сухой массы) и марь сизая (3973 мг/100 г сухой массы). Аккумуляция свободного Na^+ позволяет растению создать градиент концентраций, который увеличивает осмотическое давление клеточного сока для облегчения поглощения воды. Количество ионов Cl^- у всех растений выше, чем Na^+ ; это может быть связано с тем, что ионы Cl^- обладают большей подвижностью в почвенном растворе и меньшей токсичностью для растений по сравнению с Na^+ . Массовый приток Na^+ приводит к серьезному дефициту отрицательного заряда и для устранения ионного дисбаланса, возможно, накапливаются анионы Cl^- в органах растений [3].

Таким образом адаптация солеустойчивой лебеды направлена на избирательное накопление ионов Na^+ и Cl^- в листьях с целью понижения водного потенциала клеток.

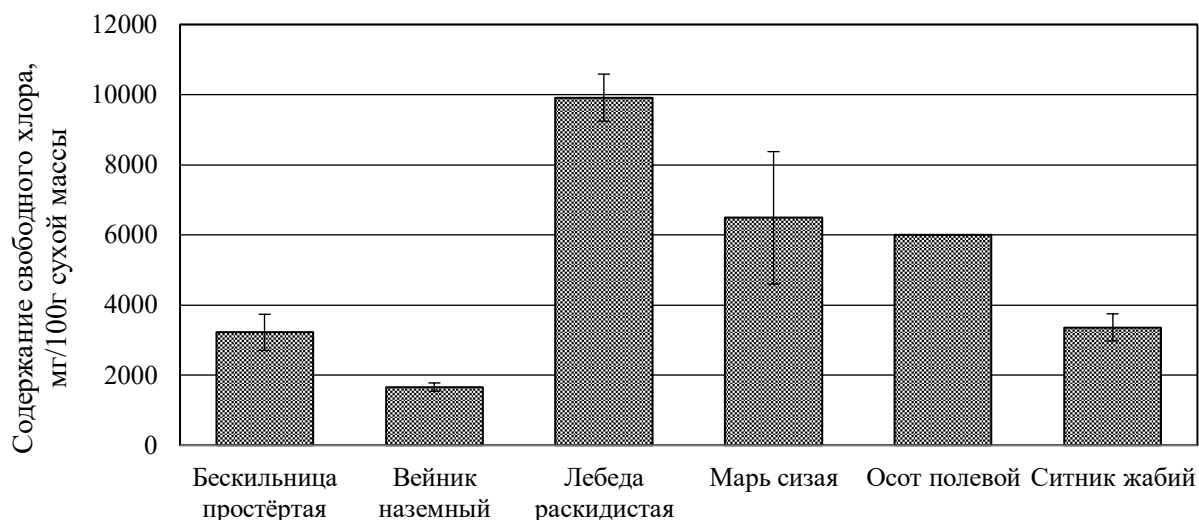


Рисунок 1 – Содержание свободного хлора в листьях исследуемых растений

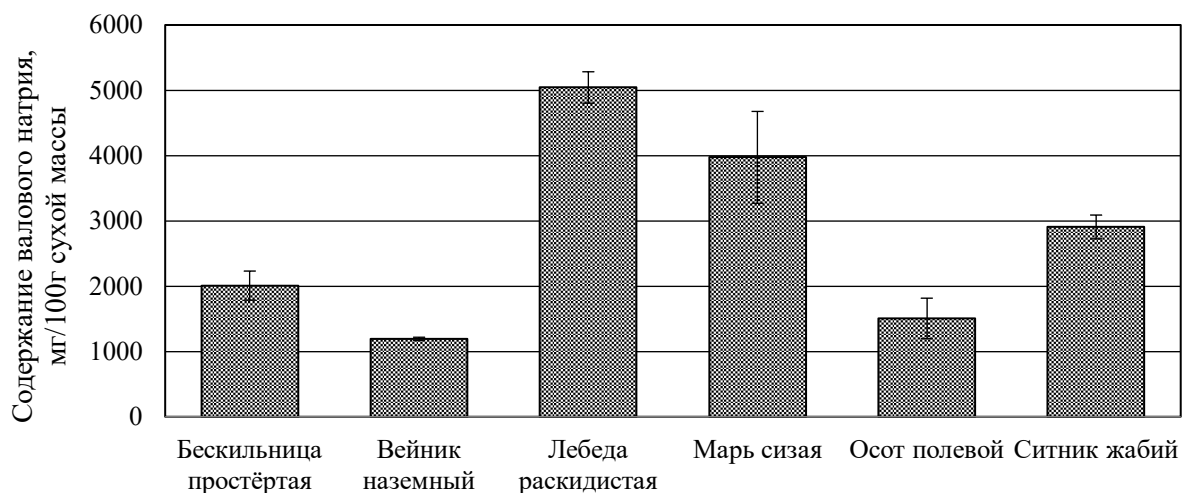


Рисунок 2 – Содержание валового натрия в листьях исследуемых растений

В растениях калий в наибольшем количестве сосредоточен в молодых, растущих тканях, характеризующихся высоким уровнем обмена веществ: меристемах, камбии, молодых листьях, побегах, почках. В клетках калий присутствует в основном в ионной форме, он не входит в состав органических соединений, имеет высокую подвижность и поэтому легко реутилизируется. Передвижению калия из старых в молодые листья способствует натрий, который может замещать его в тканях растений, прекративших рост.

Наиболее высокое содержание ионов калия в листьях характерно для осота (6264мг/100г сухой массы). У остальных растений его содержание находится в пределах 2296-5496мг/100г сухой массы (рис. 3). В целом ионов K^+ в листьях растений больше, чем Na^+ , что свидетельствует о селективном поглощении катионов. В условиях засоления Na^+ конкурирует с K^+ при поглощении и передвижении по общей транспортной системе растения, т.к. по свойствам он близок к калию, а концентрация его в почвенном растворе обычно выше, тем более по мере усиления засоления [6]. По-видимому, в растениях зоны солеотвалов при большом накоплении ионов Cl^- ионы K^+ обеспечивают электронейтральность клеточных растворов.

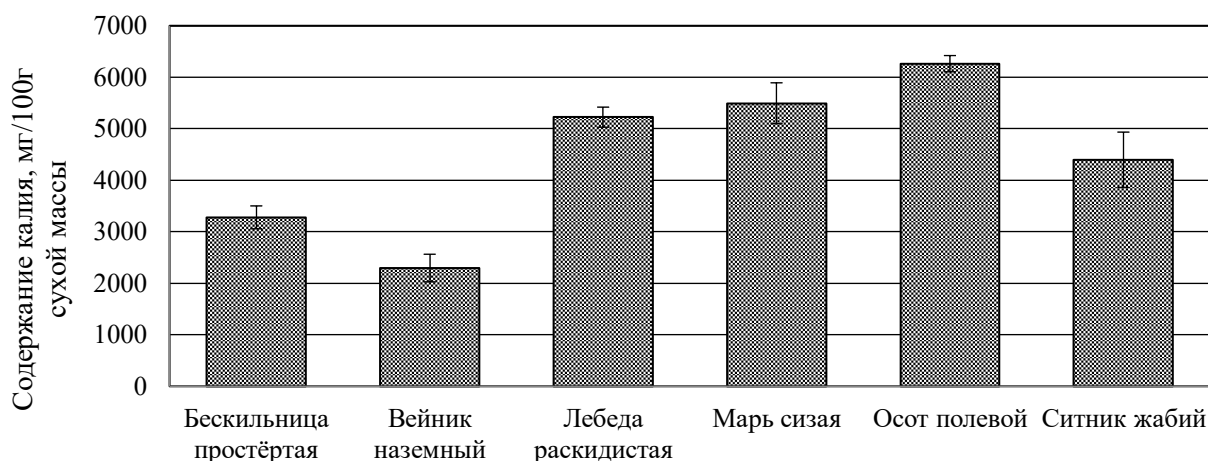


Рисунок 3 – Содержание калия в листьях исследуемых растений

Роль кальция в регуляции клеточных процессов при солевом стрессе заключается, в частности, в формировании проницаемости мембран. При выращивании растений в среде с недостатком кальция увеличивается проницаемость мембран, и они перестают быть барьерами, препятствующими свободной диффузии ионов [5]. Ограничивая поступление ионов, кальций повышает устойчивость растений к засолению, поскольку способствует устранению токсичности избыточных концентраций ионов аммония, алюминия, марганца, железа. Ионы кальция являются универсальными вторичными мессенджерами и оказывают регулирующее влияние на многие стороны метаболизма [2].

Максимальное содержание ионов кальция зафиксировано в листьях осота полевого 1261 мг/100г сухой массы (рис.4). У остальных растений показатели гораздо ниже и варьируют в пределах 210 – 350 мг/100г сухой массы.

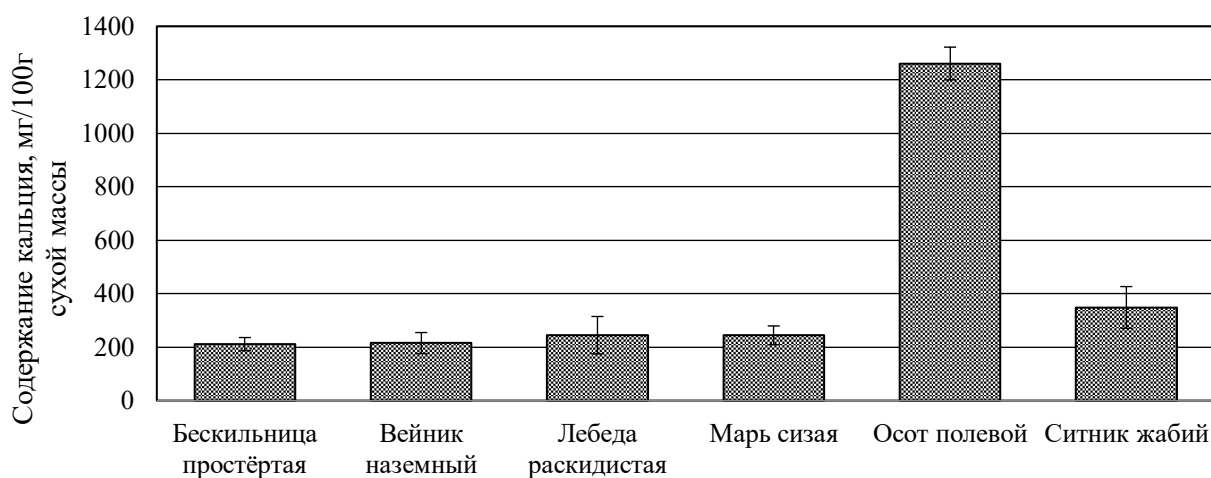


Рисунок 4 – Содержание кальция в листьях исследуемых растений

Растения, произрастающие в зоне техногенного засоления, накапливали значительное количество Na^+ и особенно Cl^- . В основе высокой солеустойчивости галофита лебеды раскидистой лежит её способность к избирательной аккумуляции засоляющих ионов с целью понижения водного потенциала клеток. Высоким содержанием ионов калия и кальция отличился осот полевой.

Список цитируемой литературы

1. Бойко Л.А. Солевой обмен растений; Перм. ун-т. – Пермь, 1981. – С. 80.
2. Еремченко О.З., Четина О.А., Кусакина М.Г., Шестаков И.Е. Техногенные поверхностные образования зоны солеотвалов и адаптация к ним растений. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2013. 148 с.].

3. Ефимова М.В., Коломейчук Л.В., Бойко Е.В., Малофий М.К., Видершпан А.Н., Плюснин И.Н., Головацкая И.Ф., Мурган О.К., Кузнецов В.В. Физиологические механизмы устойчивости растений *Solanum tuberosum* L. к хлоридному засолению // Физиология растений. – 2018. №3. – С. 196 – 206.
4. Казанцева М.Н., Сванидзе И.Г., Якимов А.С., Соромотин А.В. Трансформация луговых фитоценозов долины Иртыша в связи с воздействием минерализованных артезианских вод // Растительные ресурсы. 2014. Вып. 2. С. 216–226.
5. Кошкин Е.И. Патофизиология сельскохозяйственных культур: учеб. пособие / Е. И. Кошкин. – Москва, 2016. – 304с.
6. Медведев С.С. Физиология растений: учебник. – СПб.: БХВ-Петербург, 2013. – С. 512.

НОВЫЕ И РЕДКИЕ ВИДЫ ГРИБОВ ООПТ «АНДРОНОВСКИЙ ЛЕС»

Татаринов Н.Д., Переведенцева Л.Г.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: ООПТ, «Андроновский лес», макромицеты, новые виды, редкие виды

Особо охраняемая природная территория – охраняемый ландшафт местного значения «Андроновский лес», образован в 2015 г. по предложению специалистов географического факультета ПГНИУ. Территория расположена южнее микрорайона Нагорный в долине реки Мулянки [1] и имеет значительную расчленённость, представляя собой слабоволнистую всхолмлённую равнину, включающую пойму р. Мулянки, склоны и аллювиальные террасы [2, 4]. Почвенный покров ООПТ представлен разностями серогумусовых и дерново-подзолистых почв, также присутствуют редкие для края типы почв тёмногумусовая и дерново-карбонатная [1, 2, 7].

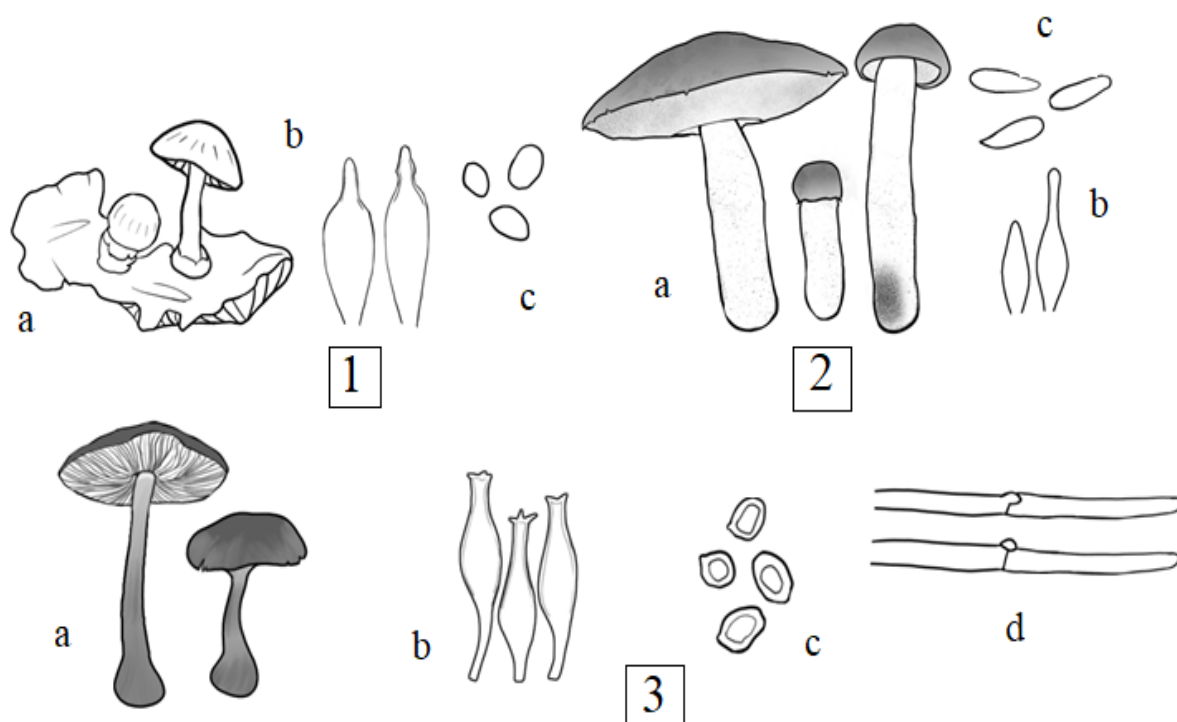
Растительность в основном представлена лесными сообществами, занимающими примерно 86% территории, главным из которых является темнохвойный лес. Присутствуют светлохвойные леса в виде сосняков, имеются осинники, сероольхово-ивовые заросли, а также – травяные сообщества [4]. Всего выявлено 288 видов сосудистых растений [5].

Сбор грибов проводился маршрутным методом на ООПТ «Андроновский лес» в августе–сентябре 2019 г. и с мая по октябрь 2020–2021 гг. Названия и объем таксонов приведены согласно базе данных MycoBank [8].

В результате исследований выявлено 110 видов макромицетов (отдел Basidiomycota). Новыми для Пермского края оказались 3 вида: *Volvariella surrecta* (Knapp) Singer – вольвариелла приподнятая, *Leccinum albobostipitatum* den Bakker & Noordel. – подосиновик белоснежный, *Pluteus pouzarianus* Singer – плутей Поузара. На территории ООПТ «Андроновский лес» обнаружен гигроцибе, попугайский гриб, *Gliophorus psittacinus* (Schaeff.) Herink, который внесён в Красную книгу Пермского края (Приложение) [3]. Редкими для края являются ежевик коралловидный – *Hericium coralloides* (Scop.) Pers. и головач гигантский – *Calvatia gigantea* (Batsch ex Pers.) Lloyd [6]. Далее приводится краткое описание обнаруженных видов грибов.

Volvariella surrecta (Knapp) Singer – вольвариелла приподнятая («паразитическая») (рисунок 1.1). Гриб растёт на разрушающихся плодовых телах *Clitocybe nebularis* – говорушки осенней. Шляпка до 6 см диаметром, выпуклая, сухая, беловатая, волокнистая, шелковистая. Мякоть беловатая, пресная. Пластинки свободные, розоватые, отпечаток спор розоватый. Ножка одноцветная со шляпкой. Вольва свободная. Споры 6,9–7,9 × 4,0–5,0 мкм, обвальные, яйцевидные. Цистиды бутылковидные, 50,3–75,4 × 12,2–22,4 мкм. Редкий вид, обнаружен в Европе, Северной Африке, Америке, Индии, Китае, Корее, Новой Зеландии. В России выявлен был только в Амурской области (внесён в Красную книгу Амурской области).

Leccinum albstipitatum den Bakker & Noordel. – подосиновик белоснежный (рисунок, 2). Шляпка 8–25 см в диаметре, вначале полушаровидная, при созревании плоско-выпуклая. Край у молодых плодовых тел со свисающей кожицей до 4 мм длиной, которая с возрастом исчезает. Поверхность слегка бархатистая, красная оранжевая, коричневая. Гименофор трубчатый, приросший, желтовато-белый, коричневый в местах повреждений; поры 0,5 мм в диаметре. Ножка 50–270 мм длиной, 15–30 мм в диаметре, цилиндрическая, иногда утолщённая книзу, белая, поверхность густо покрыта белыми чешуйками (у основания часто с голубым оттенком), у старых плодовых тел чешуйки приобретают красно-коричневый цвет. Мякоть белая, при повреждении сначала часто приобретает винно-красный оттенок, затем сереет, чернеет; в основании ножки часто становится синеватой. Споры 11.0–17.0 × 4.0–5.0 (5.5) мкм, веретеновидные. Базидии 25–35 × 7.5–11.0 мкм, булабовидные, 2- или 4-споровые. Цистиды 20–45 × 7–10 мкм, бутылеобразные. Пилеипеллис состоит из цилиндрических элементов, на концах часто конических, 35–80 × 4.0–15.5 мкм, с внутриклеточными гранулами желтовато-коричневого цвета. Каулоцистиды 15–35 × 10.0–16.0 мкм, булабовидные, веретеновидные, бутылеобразные.



Новые виды грибов для Пермского края: 1 – *Volvariella surrecta*; 2 – *Leccinum albstipitatum*; 3 – *Pluteus pouzarianus*. Условные обозначения: а – внешний вид плодового тела; б – цистиды; с – споры; d – гифы пилеипелиса

Pluteus pouzarianus Singer – плютей Поузара (рисунок 1.3). Шляпка до 10 см в диаметре, от полусферической или колокольчатой до выпуклой или плоско-выпуклой формы, с низким и широким бугорком или без него, с неглубоким углублением в центре или без него; поверхность гладкая или внутренне радиально фибриллярная, с четко выраженными чешуйками в центре или без них; коричневая или серо-коричневая, слегка клейкая во влажном состоянии; край гладкий или слегка полупрозрачно-полосатый. Пластинки свободные, в молодом возрасте белые, позже розовые, с ровными или белыми хлопьевидными краями. Ножка размером 4–6 см × 0,4–2 см, цилиндрическая, с расширенным основанием; поверхность белая, обычно с продольными коричневыми или серо-коричневыми волокнами, редко полностью голые. Запах речный. Отпечаток спор розовато-коричневый. Споры 6,0–8,6 (–9,5) × (4,0–) 4,5–5,7 (–6,2) мкм, эллипсоидные. Хейлоцистиды 20–70 × 10–25 (–30) мкм, булабовидные, рогатые (до 5 рогов). Пилеипеллис с концевыми элементами 60–130 (–150) ×

7–17 (–25) мкм, с коричневым внутриклеточным пигментом, с тонкими гладкими стенками и пряжками.

Gliophorus psittacinus (Schaeff.) Herink – попугайский гриб. *Шляпка* 0,5–2,5 см в диаметре, от полушаровидной до широко выпуклой, гладкая, слизистая, варьируется по цвету, но часто сначала шляпки темно-зелёные, быстро переходящие в оранжево-желтый цвет от центра к краям; в зрелости тускло-оранжево-жёлтый. *Пластинки* узко прикреплены к ножке, обычно сначала бледно-зелёные, затем становятся желтоватыми, но иногда оранжево-желтыми, на протяжении всего развития. *Ножка* длиной 1–4 см; толщиной 0,2–0,3 см, ровная; гладкая, слизистая, бледно-зелёная сверху и оранжево-желтая снизу в молодом возрасте, постепенно переходящая в бледно-желтоватый. Трама беловатая, тонкая. Запах несколько неприятный, вкус слабокислый. Споровый порошок белый. *Споры* 6–9 x 3,5–4,5 мкм, гладкие, эллипсоидные. Базидии 4-споровые, иногда 2-споровые. Цистиды отсутствуют. Гриб внесён в Красную книгу Пермского края (Приложение) [3].

Hericium coralloides (Scop.) Pers. – ежовик коралловидный. *Плодовое тело* 8–20 см в поперечнике; состоит из ветвей, исходящих из более или менее центрального стержня, прикреплённого к дереву, ветви толщиной 0,5–1 см, гладкие, с мясистыми шипами, 0,5–1 см длиной, до 1 мм шириной, в свежем виде белые, в старости приобретают желтоватый или коричневатый оттенок. Мякоть белая, не меняется на срезе. Запах и вкус без особенностей. Споровый порошок белый. *Споры* 3–4 x 2,5–3,5 мкм, шаровидные; гладкие или слегка шероховатые. Базидии 16–20 x 3–4 мкм, 4-споровые. На территории Пермского края – редкий вид.

Calvatia gigantea (Batsch ex Pers.) Lloyd – головач гигантский. *Плодовое тело* шаровидное, реже яйцевидное, приплюснутое, 25 см в диаметре, массой около 1 кг. Снаружи плодовое тело сначала белое, затем, по мере созревания желтеет и буреет. Оболочка растрескивается на куски неправильной формы и отпадает, обнажая глебу, сначала белую, по мере созревания желтеющую и зеленеющую. Зрелая глеба оливково-коричневая. Споровый порошок темно-коричневый. Споры 2,5–4 мкм, от шаровидных до овальных, гладкие и толстостенные. На территории Пермского края – редкий вид.

Таким образом, макромицеты ООПТ «Андроновский лес» как гетеротрофный компонент биогеоценозов отличаются разнообразием. Территория является местом обитания 3-х новых видов для Пермского края, одного вида, внесённого в Красную книгу Пермского края и 2-х редких видов грибов-макромицетов.

Список цитируемой литературы

1. Атлас особо охраняемых природных территорий Пермского края / под. ред. С. А. Бузмакова. Пермь: Астер, 2017. 512 с.
2. Воронов Г.А., Кулакова С.А., Андреев Д.Н., Гатина Е.Л., Зайцев А.А, Санников П.Ю., Шумихин С.А. / Особо охраняемые природные территории г. Перми: монография. Пермь: гос. ун-т., 2011. 204 с.
3. Красная книга Пермского края / под общ. ред. М. А. Бакланова. Пермь: Алдари, 2018. 232 с.
4. Михайлова О.В. ООПТ местного значения «Андроновский лес» // Экология города: состояние и охрана окружающей среды г. Перми. Пермь, 2015. С. 70–72.
5. Овеснов С.А., Молганова Н.А., Каракулова Ю.С. Конспект флоры ООПТ «Андроновский лес» // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2018. Вып. 4. С. 358–363.
6. Переведенцева Л.Г. Грибы лесов и зелёных насаждений города Перми // Пермь: Астер, 2021. 262 с.

7. Саначёв В.С. К первой годовщине создания ООПТ «Андроновский лес» // Экология города: состояние и охрана окружающей среды г. Перми. Пермь, 2016. С. 91–93.
8. MycoBank Database [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.mycobank.org>, свободный (дата обращения: 20.02.2021).

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ ЧЕЛОВЕКА

Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.^{1,2}, Ужвиюк С.В.¹, Шардина К.Ю.¹, Заморина С.А.^{1,2}

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

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: гликоделин, дифференцировка, Т-хелперы 17 типа, регуляторные Т-клетки

Беременность является феноменом с точки зрения иммунологии и парадоксом с точки зрения трансплантологии. На местном и системном уровнях в поддержание иммунологической толерантности матери к плоду вовлечены клеточные и гуморальные факторы иммунитета, постоянно взаимодействующие друг с другом. Среди гуморальных факторов выделяются гликопротеины плаценты, которые обладают иммуномодулирующими свойствами, и имеют перспективы применения в качестве биопрепаратов в трансплантологии. Один из этих гликопротеинов, гликоделин (Gd), был открыт российскими учеными Петруниным и Татариновым в 1976 году. Название этого гликопротеина отражает его уникальную особенность – различное гликозилирование в зависимости от пола. Биологические функции Gd, такие как ангиогенная, эндокринная и ограничивающая инвазию трофобласта, способствуют развитию плаценты. Его иммуномодулирующие эффекты преимущественно направлены на защиту плода от иммунной системы матери, то есть иммуносупрессивны [1]. Регуляторные Т-клетки (Treg) и Т-хелперы 17 типа (Th17) являются центральными субпопуляциями лимфоцитов, вовлеченными в формирование иммунологической толерантности при беременности. Соотношение количества клеток именно этих субпопуляций определяет, будет создаваться в фетоплацентарном комплексе провоспалительная среда (в случае увеличения Th17) или нет (в случае преобладания Treg) [2].

В настоящее время есть данные о том, что гликоделин подавляет пролиферацию и стимулирует апоптоз Т-клеток. Сдвигает поляризацию наивных CD4⁺ Т-клеток в сторону Т-хелперов типа 2 (Th2), которые благоприятствуют развитию беременности, (но не провоспалительной популяции Th1), и подавляет цитотоксические эффекты CD8⁺ Т-клеток [1,3]. Однако роль этого гликопротеина беременности в дифференцировке провоспалительной (Th17) и противовоспалительной (Treg) субпопуляций Т-хелперов не исследована. Таким образом, целью нашего исследования является определение эффектов гликоделина на дифференцировку провоспалительной субпопуляции Т-лимфоцитов Th17 и противовоспалительной субпопуляции Т-лимфоцитов Treg.

Концентрации гликоделина для эксперимента были выбраны на основе его концентраций в сыворотке крови беременной женщины (0,2 и 2 мкг/мл) – 1 и 2 триместры беременности, 10 мкг/мл – концентрации в амниотической жидкости в начале беременности [4].

Выделенные из мононуклеаров периферической крови наивные Т-хелперы культивировали в Th17- или Treg- поляризующих условиях (ТКР-активатор+комплекс цитокинов и антител) с добавлением рекомбинантного гликоделина (E. coli, Mybiosource) в концентрациях 10, 2 и 0,2 мкг/мл в течение 7 или 3-х дней, соответственно.

После этого анализировали жизнеспособность лимфоцитов, их пролиферацию, и определяли процент клеток в популяциях Th17 или Treg. В случае с Th17 определяли процент их субпопуляций, а также концентрацию интерлейкина 17 в супернатантах культур. После 3-дневной культивирования в Treg-поляризующих условиях мы собирали и окрашивали клетки с использованием панели моноклональных антител для идентификации Treg (Human CD4 Treg Surface ID Panel, Biolegend, США) на проточном цитометре. Итоговый фенотип Treg: 7-AAD⁻CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127^{-low}. После 7 дней культивирования в Th17-поляризующих условиях мы собирали клетки и определяли процент Th17 (ZA⁻CD3⁺CD4⁺CCR6⁺) клеток на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Для этого использовали антитела против CXCR3-PE-Vio615 человека, CD4-PerCP, CCR4-PE-Vio 770, CCR6-APC (все Miltenyi Biotec, Германия) и CD3-Pacific BlueTM (BioLegend, США). Соотношение субпопуляций Th17 мы оценивали, как процент клеток CCR4⁺CXCR3⁻, CCR4⁺CXCR3⁺, CCR4⁻CXCR3⁻, CCR4⁻CXCR3⁺ в гейте ZA⁻CD3⁺CD4⁺CCR6⁺ [5].

Нами не выявлено влияния гликоделина на процент пролиферирующих лимфоцитов в культурах, а также на процент апоптотирующих и мертвых клеток. Эти данные согласуются с описанными другими исследователями результатами, в которых негликозилированные рекомбинантные формы гликоделина не влияли на пролиферацию лимфоцитов [6].

При изучении влияния гликоделина на дифференцировку Treg, обнаружено, что гликоделин не влиял на количество противовоспалительных Treg в культуре Т-хелперов. При этом очевидно, что экспериментальная система работает, так как активация клеток приводила к достоверному повышению уровня Treg в контрольных пробах. Не было обнаружено никаких эффектов препарата ни в одной из концентраций. Однако, это было показано в предварительных экспериментах (n=3). Вероятно, что при увеличении n ситуация может измениться.

Гликоделин в высокой концентрации (10 мкг/мл) имеет тенденцию к повышению процента общей субпопуляции Th17, то есть клеток, экспрессирующих CCR6. Также обнаружено повышение концентрации основного цитокина Th17 интерлейкина 17, которое положительно коррелировало с повышением процента общей популяции Th17. Есть выраженная тенденция к повышению концентрации интерлейкина-17 в культурах с 2 мкг/мл гликоделина. Достоверных изменений не выявлено. При анализе процентного соотношения клеток внутри популяции Th17 обнаружено перераспределение субпопуляций в пользу переходных клеток, обладающих повышенной пластичностью, которые могут при изменении условий трансдифференцироваться в любой фенотип.

Таким образом, была выявлена тенденция к стимуляции дифференцировки провоспалительной субпопуляции Th17 гликоделином в концентрации 2 и 10 мкг/мл, но не было выявлено влияния гликоделина на дифференцировку противовоспалительной субпопуляции Т-хелперов человека Treg.

Наш результат подчеркивает важность гликозилирования гликопротеинов для проявления иммуносупрессивного эффекта. Работа будет продолжена с рекомбинантной гликозилированной (НЕК 293) формой гликоделина, соответствующей нативному гликоделину А.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-04055 мк.

Список цитируемой литературы

1. Bochkova M.S., Zamorina S.A., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Rayev M.B. The role of glycodelin in the regulation of the immune system in the context of developing pregnancy // Medical Immunology (Russia). – 2019. -V. 21 (4). – P. 603-616.
2. Figueiredo A.S., Schumacher A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy//Immunology. – 2016. – V. 148(1). – P.13-21.

3. Cui J., Liu Y., Wang X. The Roles of Glycodelin in Cancer Development and Progression// Front. Immunol. -2017. – V. 8, № 1685.
4. Halttunen M, Kämäräinen M, Koistinen H. Glycodelin: a reproduction-related lipocalin// Biochim Biophys Acta. – 2000. – V. 18; 1482 (1-2). – P.149-56.
5. Cerboni, S., Gehrmann, U., Preite, S., Mitra, S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases // Immunology. – 2021. – V. 163(1). – P. 3-18.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЛИКОДЕЛИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ *IN VIVO*

Тройнич Я.Н.¹, Чарушина Ю.А.¹, Логинова Н.П.¹, Заморина С.А.²

¹Пермский государственный медицинский университет им. академика. Е.А. Вагнера
Минздрава России, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет Пермь, Россия

Ключевые слова: аллотрансплантат, органы иммунной системы, гликоделин.

Известно, что иммунологическая реакция на донорский материал включает целый комплекс последовательных клеточных и тканевых процессов, которые суммарно обуславливают клиническую картину отторжения. Наиболее значительные изменения в иммунной системе реципиента происходят в первые 2-3 недели после трансплантации [1], в течение которых иммунный ответ на аллоантигены значительно превышает таковой на антигены микроорганизмов. Гликоделин (PP14, RAEP, альфа-2-микроглобулин, димерный гликопротеин с молекулярной массой 42 до 56 кД) рассматривается как маркер рецептивности репродуктивной ткани [2]. В 2018 г. стало известно, что гликоделин препятствует отторжению трансплантата в эксперименте [3], что открывает для него фармакологические перспективы. Предположение о возможном применении гликоделина в случае трансплантации легкого, было сделано также Schneider et al. [4,5].

Таким образом, цель исследования: оценка морфофункционального состояния органов иммунной системы в динамике 3-х недель эксперимента по изучению действия гликоделина при аллогенной трансплантации клеток костного мозга представляется адекватной и современной.

Материалы и методы. В эксперименте задействованы белые крысы самцы линии Wistar (n=24) в возрасте от 2-3 месяцев (m = 250 г). Животные были разделены на 3 группы: 1-я (n=6), которым вводили взвесь костного мозга (10⁷ клеток, обработанных камптотецином (50 мкг/мл, «Tocris Bioscience», Великобритания), в 100 мкл среды RPMI-1640 («Sigma», США) внутривенно); 2-я (n=12) вводилась взвесь костного мозга в комплексе с гликоделином. Гликоделин вводили внутримышечно в объеме 14 мг/100 мкл физиологического раствора, в следующем режиме: на 1, 5, 9 и 12 сутки в физиологической концентрации, характерной для периода беременности (~0,75 мкг/мл); 3-я (n=6) контрольная, интактные животные. Выведение животных из эксперимента проводилось на 3, 7, 14 и 21 сут. в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными. С помощью обзорного гистологического метода исследования изучили тимус, селезенку, брыжеечные лимфатические узлы и пейеровы бляшки. Обработку органов проводили стандартным методом заливкой в парафин и окрашиванием срезов гематоксилин-эозином.

Оценку гистологических препаратов проводили с использованием микроскопов Leica DM2500 и Carl Zeiss LSM 710 и программных пакетов для захвата и анализа изображений Leica Application Suite и Zen 2010 при увеличении в 10x40 и 10x60. Общеклинические исследования: параллельно забору органов на гистологию, производили забор мононуклеарных клеток крови и плазмы крови (из цельной крови) для последующей заморозки. В цельной крови осуществляли подсчет лейкочисла и лейкоформулы.

Результаты и их обсуждение. При анализе показателей крови показано, что в группе интактных животных лейкочисло и показатели общего анализа крови оставались стабильными в течении всего эксперимента. В группе введения клеток костного мозга отмечено повышение лейкочисла на 3 сутки, которое затем возвращалось к средним значениям. Применение гликоделина отменяло это повышение числа лейкоцитов, приводя в динамике эксперимента показатели к состоянию интактных животных. Довольно интересно, что показатели лейкоформулы в группе введения костного мозга не отличались от интактных животных. Применение гликоделина на 3 сутки эксперимента приводило к повышению уровня моноцитов и нейтрофилов, на последующих сроках эксперимента достоверных различий с интактными животными и группой контроля не было.

Гистологическое исследование органов иммунной системы показало, что в группе интактных животных в изучаемых органах морфологическая картина без особенностей и имела признаки физиологической нормы. Анализ органов при аллогенной трансплантации фракции клеток костного мозга показал, что в тимусе на протяжении 21 дня исследования имелась реакция со стороны сосудов, уменьшение объема лимфоидной ткани, липоматоз. К концу эксперимента, в органе развиваются признаки акцидентальной инволюции от I до III степени. Во вторичных органах иммунопоэза (селезенка, лимфатические узлы) на протяжении всего эксперимента регистрировали увеличение доли лимфоидной массы во всех функциональных зонах. В белой пульпе селезенки верифицировались крупные лимфоидные узелки, все в состоянии активности. В них процессы пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда. Во всех зонах органа имеется активность макрофагов. В брыжеечных лимфатических узлах увеличение лимфоидной массы в Т- и В-зависимых зонах. Синусы расширены и переполнены лимфоцитами, просматривается миграция их через стенку синуса. В крупных лимфоидных узелках процессы пролиферации и дифференцировки клеток, явления плазматогенеза. Как результат, в паракортикальной зоне и в мозговых тяжах формируются скопления плазматических клеток. В этих участках установлено присутствие активных макрофагов и эозинофилов. В пейеровой бляшке на протяжении всего срока эксперимента (3 – 21 сут) лимфоциты заполняет всю толщину собственной пластинки слизистой. Узелки крупного размера, все в состоянии функциональной активности, также явления пролиферации и дифференцировки. Большая часть межузелковых пространств заполнена лимфоцитами, к 21 сут имеется тенденция к их слиянию.

Таким образом, внутрибрюшинное введение клеток костного мозга вызвало активацию органов иммунной системы в виде активной пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда. В результате, костный мозг как трансплантат, обеспечивает значительное увеличение объема лимфоидной ткани во всех органах иммунной системы.

Введение гликоделина дополнительно к аллогенной трансплантации клеток костного мозга показало его способность активировать клетки иммунной системы, в направлении их пролиферации и дифференцировке. На этом фоне, в органах отсутствуют признаки воспаления и гибели клеток путем апоптоза. С 14 дня эксперимента в органах верифицируются эозинофильная инфильтрация, что является косвенным положительным признаком приживления трансплантата. Так, в тимусе, на протяжении эксперимента, наблюдали активный лимфопоэз. В дольках увеличилась толщина коркового вещества. Многочисленные тимоциты формируют плотные скопления. Между ним просматривались макрофаги. К концу исследования объем лимфоидной ткани увеличивается во всех зонах органа. Явления

инволюции не верифицировались. В органах вторичного звена иммунной системы процессы пролиферации и дифференцировки лимфоцитов наблюдались с самого начала исследования. С 7 суток в функциональных зонах появляются плазматические клетки, и до 21 дня их количество увеличивается. Повсеместно присутствуют эозинофилы и клетки макрофагального ряда.

В селезенке функциональные зоны белой пульпы до конца эксперимента продолжают оставаться в активном состоянии, но размеры Т и В зон становились меньше или не изменялись. К 21 сут пролиферативные процессы несколько снижались, а повышался дифференцировочный потенциал, что отразилось на численности плазматических клеток. Аналогичная ситуация имела и в лимфатических узлах.

На 21 сутки пролиферативные процессы в В- и Т- зонах продолжают, но имеется тенденция к стабилизации (снижения) активности. Лимфоидные узелки продолжают оставаться крупными, активными, тенденции к их слиянию нет. Синусы широкие, хорошо просматриваются, в просвете синусов лимфоциты, макрофаги и эозинофилы. Аналогичные процессы имелись и в пейеровых бляшках. К середине исследования (14 сут) лимфоидная ткань переполняла орган, но к 21 сут размеры лимфоидных узелков оставались крупными, в них замедлились процессы пролиферации и дифференцировки. Четко верифицировался купол органа с покрывающим его столбчатым эпителием. В целом, к концу эксперимента в пейеровых бляшках явления гиперплазии.

Таким образом, на фоне аллогенной трансплантации клеток костного мозга гликоделин способствует активации клеток иммунной системы, в направлении их пролиферации и дифференцировке. На этом фоне, в органах отсутствуют признаки воспаления и гибели клеток путем апоптоза. С 14 дня эксперимента в органах верифицируются эозинофильная инфильтрация, что является косвенным положительным признаком приживления трансплантата. Показано, что гликоделин, в качестве развития адаптационно-приспособительного механизма, усиливает пролиферативные процессы во вторичных органах иммунной системы, регулируя появление новой генерации клеток, поддерживающей реакцию организма по отношению к трансплантату и качественно влияет на структурное состояние органов в целом.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-04055 мк.

Список цитируемой литературы

1. Niederkorn, J.Y. See no evil, hear no evil, do no evil: The lessons of immune privilege / J.Y. Niederkorn // Source of the Document Nature Immunology. -2006. – V.7 (4). – P. 354-359.
2. Посисеева Л.В., Герасимов А.М., Петрова У.Л. Гликоделин в акушерско-гинекологической практике: прошлое, настоящее, будущее. Проблемы репродукции. - 2020. – 26 (3) –С. 11-22.
3. Dixit A., Balakrishnan B., Karande A.A. Immunomodulatory activity of glycodelin: implications in allograft rejection. Clin. Exp. Immunol. -2018- 192(2): 213-223.
4. Schneider M., Meister M., Muley T. Glycodelin as diagnostic and prognostic marker and for monitoring treatment of lung diseases. European patent application, Bulletin 2016.06. EP2982765A1.
5. Schneider M.A., Granzow M., Warth A., Schnabel P.A., Thomas M., Herth F.J., Dienemann H., Muley T., Meister M. Glycodelin A new Biomarker with Immunomodulatory Functions in Non-Small Cell Lung Cancer. Clinical cancer research. -2015. – V.21 (15): 3529–3540.

ПОЛУЧЕНИЕ ОБОГАЩЕННЫХ ЭКСТРАКТЕЧНЫМИ ТИОЛАМИ КУЛЬТУР *ESCHERICHIA COLI*

Тюленев А.В.¹, Смирнова Г.В.¹, Октябрьский О.Н.¹, Габова А.О.²

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

²Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: тиолы, глутатион, *Escherichia coli*

Глутатион (GSH) – низкомолекулярный тиолсодержащий трипептид, который присутствует в клетках всех эукариот, грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий [1]. В цитоплазме GSH несет функцию основного редокс-буфера, а также играет ключевую роль в защите клеток от окислительного, осмотического, теплового стрессов, воздействия некоторых антибиотиков, соединений хлора и токсинов. В цитоплазме и периплазматическом пространстве он может находиться в виде двух биологически активных форм: восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG). Глутатион широко применяется в медицине как антиоксидант и в фармацевтической промышленности для производства антиоксидантов, антидотов, крио- и радиопротекторов. В пищевой промышленности, на основе восстановленного глутатиона производятся биологически активные добавки и компоненты спортивного питания. В косметологии GSH является важным компонентом инъекций для мезотерапии кожных покровов, а также входит в состав различных кремов, масок и других продуктов для омоложения и отбеливания кожи.

В биотехнологии в качестве основных продуцентов глутатиона используются генно-инженерные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis*. В настоящее время существует достаточно большое количество методов и запатентованных промышленных биотехнологических технологий получения глутатиона. В основе всех технологических процессов лежит экстракция тиола из внутриклеточного содержимого с предварительной дезинтеграцией клеточной стенки. Одним из недостатков такого способа извлечения вещества является необходимость применения множественных стадий очистки для получения конечного продукта, пригодного для практического применения.

В настоящее время опубликованы теоретические исследования, в которых показана возможность использования мутантных штаммов *E. coli* в качестве продуцентов глутатиона [2]. Бактерии, в отличие от эукариотических организмов, могут быть более привлекательными объектами для биотехнологического получения GSH, в силу меньшей требовательности к компонентам питательной среды и условиям культивирования.

Материалы и методы.

В исследованиях использовали делеционные мутанты *E. coli* JW2669 (*recA*), дефектный по системе SOS-ответа, и MG1655-*lpcA*, дефектный по синтезу компонента липополисахарида клеточной стенки, а также соответствующие родительские штаммы BW25113 и MG1655.

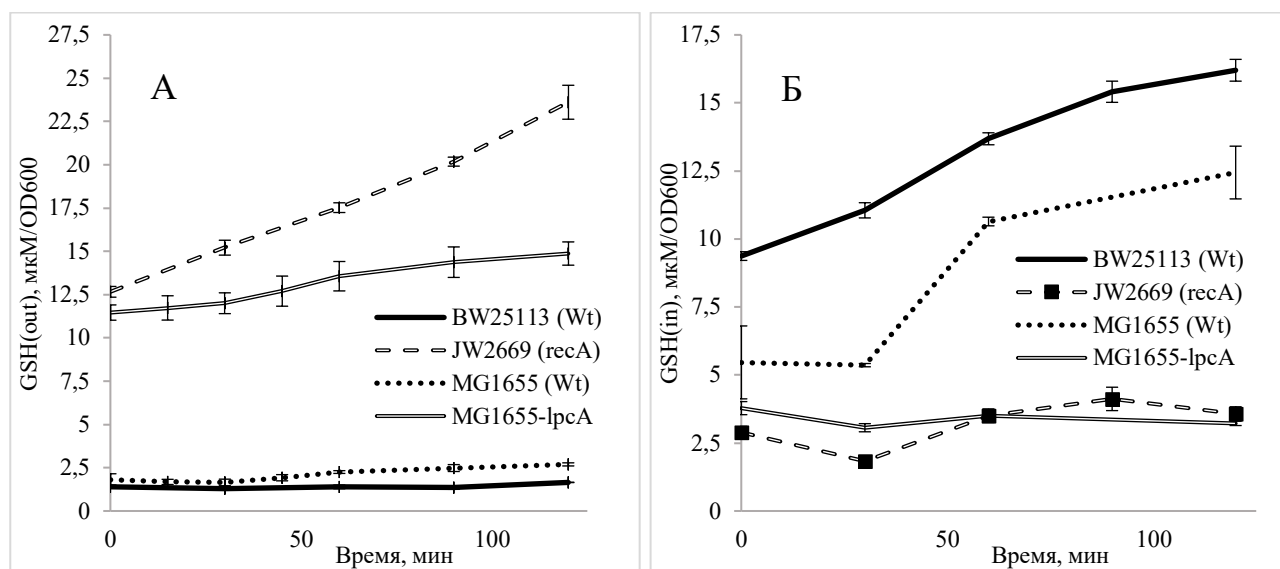
Культивирование бактерий осуществляли на среде M9 с 0,15% глюкозы в колбах на орбитальном термостатируемом шейкере или в открытом мини-ферментере оригинальной конструкции при 37°C в аэробных условиях с поддержанием парциального давления кислорода (dO_2) не ниже 40%. Контроль физиологических параметров (dO_2 , pH) осуществляли с помощью аппаратного комплекса ферментера BioFlo 110 (New Brunswick Scientific, USA). Для определения количества внутри- и экстраклеточного глутатиона применялся модифицированный высокоспецифичный метод Титца [3].

Экспериментальная часть и обсуждение.

Ранее было обнаружено, что аэробно-растущие культуры бактерий *Escherichia coli* содержат микромолярные количества глутатиона [4].

В нормальных условиях у *E. coli*, аэробно растущей в среде М9 с сульфатом, уровень экстраклеточного глутатиона (GSH_{out}) значительно ниже, чем уровень внутриклеточного глутатиона (GSH_{in}). При различных стрессах, сопровождающихся остановкой роста *E. coli*, наблюдаются обратимые изменения соотношения GSH_{out}/GSH_{in} , которые зависят от типа стресса и степени адаптации к новым условиям. Показано, что присутствие глутатиона в среде и его изменения при стрессах связаны с циркуляцией глутатиона между цитоплазмой клеток и средой [5].

В процессе изучения роли глутатиона в адаптации к стрессам мы обнаружили, что в отсутствие каких-либо стрессовых воздействий, штаммы *E. coli*, несущие мутации по генам *recA* и *lpcA*, демонстрируют аномальные соотношения GSH_{out}/GSH_{in} , являющееся следствием повышенного экспорта трипептида в среду (рис., А) и, одновременно, – пониженного уровня в цитоплазме (рис., Б). Уже в начале культивирования уровень экстраклеточного GSH в мутанте JW2669 (*recA*), был на порядок выше, чем в родительском штамме BW25113, тогда как уровень внутриклеточного глутатиона был примерно в три раза ниже, чем в BW25113. В отличие от родительского штамма, по мере роста культуры концентрация GSH_{out} в этом мутанте продолжала расти, увеличиваясь в два раза, и к концу наблюдения соотношение GSH_{out}/GSH_{in} возрастало еще больше (рис.). Похожая ситуация наблюдалась в MG1655-*lpcA*, в котором базовый уровень экстраклеточного GSH был выше, чем у родителя в 6 раз, а значительное превышение уровня экстраклеточного глутатиона над внутриклеточным в мутанте не только сохранялось, но увеличивалось по мере роста (рис.).



Уровни экстраклеточного (out) (А) и внутриклеточного (in) (Б) глутатиона у аэробнорастущих штаммов *E. coli*

Известные к настоящему времени данные о метаболизме глутатиона у бактерий не позволяют объяснить наблюдаемый нами феномен и требуются дальнейшие, более детальные исследования для понимания механизмов, ответственных за инверсию соотношения GSH_{out}/GSH_{in} в мутантах *E. coli*.

Тем не менее, обнаруженная способность мутантов *E. coli* *lpcA* и *recA* накапливать глутатион в среде может быть использована для разработки способа получения обогащенной этим тиолом культуральной жидкости и дальнейшего использования ее для производства очищенного GSH или GSSG. Этот способ позволит извлекать глутатион прямо из культуральной жидкости, минуя стадию дезинтеграции клеток.

Работа поддержана грантами РФФИ №19-04-00888 и грантом Президента РФ для молодых ученых МК-420.2020.4.

Список цитируемой литературы

1. Fahey, R.C. Occurrence of glutathione in bacteria / R.C. Fahey [et al.] // J. Bacteriol. – 1978. – V. 133. – P. 1126-1129.
2. Wang, D. Glutathione production by recombinant *Escherichia coli* expressing bifunctional glutathione synthetase / D. Wang [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2016 – V. 43(1):45-53.
3. Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues / F. Tietze // Anal. Biochem. – 1969. – V. 27. – P. 502-522.
4. Owens RA, Hartman PE. Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains. // J Bacteriol. – 1986. – V.168. – P.109–14.
5. Smirnova G, Muzyka N, Oktyabsky O. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. // Microbiol Res. – 2012. – V.67. – P.166–72.

БИОДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТА НАПРОКСЕНА

Тян С.М.¹, Тюмина Е.А.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

Ключевые слова: НПВС, напроксен, биodeградация, актиномицеты

В конце XX века научное сообщество обозначило новую (эмерджентную) категорию загрязнителей – фармполлютанты [1]. Обнаруживаемые в окружающей среде фермпрепараты в силу их структурных особенностей и биоактивности проявляют высокую токсичность, вызывая хронические и острые заболевания живых организмов и гибель целых популяций. Одной из наиболее часто обнаруживаемых групп лекарственных препаратов в природных средах являются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) – ингибиторы синтеза простагландинов. Известно, что при попадании в окружающую среду НПВС вызывают летальные и сублетальные эффекты даже при низких концентрациях детектирования. Существующие способы нейтрализации фармпрепаратов неэффективны и/или экологически небезопасны. Проблему фармацевтического загрязнения возможно решить с помощью микроорганизмов, способных к разложению фармвещества без образования побочных токсичных метаболитов [3–5].

Цель настоящей работы – исследование способности актинобактерий к биодеструкции НПВС на примере напроксена – производного фенилпропионовой кислоты.

В работе использовали 102 коллекционных штамма, принадлежащих к 20-ти видам актинобактерий из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, номер 285 во Всемирной федерации коллекций культур, www.iegmc.ru, реестровый номер Уникальной научной установки www.ckp-rf.ru/usu/73559). Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) производили с помощью микролуночного метода со специфическим окрашиванием 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенилтетразолием (INT-тест). Эксперименты по биodeградации вели в течение 7 сут в минерально-солевой среде RS в присутствии 100 мг/л напроксена с добавлением 0,1 об. % *n*-гексадекана в качестве дополнительного источника роста. Инокулятом служили бактериальные клетки, выращенные в течение 2–3 сут на МПА, при этом готовили клеточную суспензию (10^6 кл/мл) и вносили 0,5 мл в 30 мл среды RS.

Убыль напроксена в процессе биodeградации оценивали с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (LC Prominence 20A (Shimadzu, Япония), оборудованного хроматографической колонкой с обращенно-фазным сорбентом Discovery® C18, 25 cm × 4.6 mm, and 5µm (Supelco, США) и диодно-матричным детектором (SPD-M20A)).

По нашим данным, показатели МИК напроксена в отношении исследованных культур варьировали от 0,625 до ≥ 5 г/л. Среди наиболее устойчивых (МИК > 5 г/л) к напроксену выявлены 43 штамма, в том числе *R. qingshengii* ИЭГМ 1016, ИЭГМ 1359, *R. ruber* ИЭГМ 560, ИЭГМ 381, *R. rhodochrous* ИЭГМ 63, ИЭГМ 1360 и т.д. В сравнительных экспериментах установлено, что наиболее эффективно разлагали напроксен *R. aetherivorans* ИЭГМ 1250 (14,78%), *R. cercidiphylli* ИЭГМ 1184 (19,03%), *R. fascians* ИЭГМ 175 (17,10%), *R. rhodochrous* ИЭГМ 63 (22,86%). Абиотическая деструкция напроксена не наблюдалась, что свидетельствует о том, что убыль фармпрепарата связана с каталитической активностью актинобактерий.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-14-00132, <https://rscf.ru/project/21-14-00132/>.

Список цитируемой литературы

1. Boxall A.B.A. et al. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? // Environ. Health Persp. – 2012. – V. 120. – P. 1221–1229.
2. Pal P. Treatment and disposal of pharmaceutical wastewater: Toward the sustainable strategy // Sep. Purif. Rev. – 2016. – V. 47. – P. 179–198.
3. aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Küster A.H.A. Pharmaceuticals in the environment. Global occurrences and perspectives // Environ. Toxicol. Chem. – 2016. – V. 35. – P. 823–835.
4. Gumbi B.P., Moodley B., Birungi G., Ndungu P.G. Detection and quantification of acidic drug residues in South African surface water using gas chromatography-mass spectrometry // Chemosphere. – 2017. – V. 168. – P. 1042–1050.
5. Górny D., Guzik U., Hupert-Kocurek K., Wojcieszynska D. Naproxen ecotoxicity and biodegradation by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) strain // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2018. – V. 167. – P. 505–512.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О СУТОЧНОЙ АКТИВНОСТИ ПАУКОВ-КРУГОПРЯДОВ (ARANEI: ARANEIDAE) CYCLOSA CONICA (PALLAS, 1772) И MANGORA ACALYPHA (WALCKEANAER, 1802)

Устинова А.Л., Тиунов А.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: Araneidae, Cyclosa conica, Mangora acalypha, суточная активность

В семейство Araneidae – пауки-кругопряды входит примерно 3200 видов пауков, которые объединены в 174 рода. Это третье по величине семейство пауков в мире. В России известно порядка 100 видов из 19 родов [1]. Семейство отличается большим морфологическим разнообразием среди своих представителей. Большинство пауков-кругопрядов строят колесовидные ловчие сети для поимки жертв. При этом некоторые виды находятся на сети круглосуточно, некоторые в дневное время прячутся в специальных логовах или иных укрытиях. Устройство сети пауков-кругопрядов видоспецифично, конфигурация сетей может заметно меняться при воздействии различных факторов, в том числе антропогенных [2].

Это делает кругопрядов перспективным объектом изучения с точки зрения возможности их использования в биоиндикации. Однако, возможность использования многих видов кругопрядов в качестве модельных часто ограничена неполными данными о биологии и экологии этих видов. Поэтому целью этой работы было исследовать динамику суточной активности кругопрядов *Cyclosa conica* (Pallas, 1772) и *Mangora acalypha* (Walckenaer, 1802).

C. conica встречается по всей Палеарктике [3]. Предпочитает строить сети в подлеске хвойных или смешанных лесов [4, 5]. Сети часто имеют вертикальный стабилмент, проходящий через центр сети. Стабилмент – это белая лента, состоящая из нескольких нелипких паутинных нитей. Паук вплетает туда остатки жертв, реже – растительный мусор. Благодаря этому хищникам и жертвам сложнее его заметить.

Вид *M. acalypha* имеет Западнопалеарктический неморальный ареал [6]. Паук предпочитает засушливые леса с вересковой подстилкой [4], солонцы, заросшие злаками и полынью или территории, на которых растет ковыль [3]. Представители вида строят свои сети на низких кустарниках, иногда на сушинах и траве.

Методика исследований суточной активности. Наблюдения проводились с мая по июль в Государственном природном Троицком комплексном заказнике и представляли из себя 7 суточных учетов (по одному учету в начале каждой недели). Утром, до начала наблюдений, выбиралось 6 площадок, на которых располагалось от 1 до 3 сетей пауков-кругопрядов. При этом, если на одну площадку приходилось несколько сетей, они должны были находиться близко друг к другу. Расстояние между площадками не превышало нескольких десятков метров, чтобы сократить время перехода между ними. За сутки проводилось 12 учетных часов с перерывами в 1 час. Один час учетов делился поровну между всеми 6 площадками. Наблюдение за площадками каждый раз происходило в одинаковой последовательности (по одному маршруту).

Во время наблюдений в полевом дневнике фиксировалась продолжительность всех поведенческих актов пауков. До и после каждого учета фиксировались данные температуры и освещенности (в люксах) с помощью люксметра testo 540. Ночью наблюдения проводились при помощи светодиодного фонаря таким образом, чтобы свет фонаря не попадал прямо на сеть.

За все время полевой практики было зафиксировано поведение 39 особей вида *M. acalypha* и 15 особей вида *C. conica*. Всего за период наблюдений отмечено 26 различных поведенческих актов. Каждому акту поведения анализа был присвоен кодовый номер: 10 – ремонт существующей сети, 11 – строительство ловчей зоны, 12 – строительство центральной зоны, 13 – строительство радиусов, 14 – строительство основы сети (рамы, якорей), 15 – строительство стабилмента, 16 – ожидание во время строительства (фиксировалось только если превышало 3 сек), 17 – передвижение по сети во время строительства, 18 – чистка сети, 19 – поедание сети, 20 – создание вибрации на сети (определение местоположения жертвы), 21 – движение к месту вибрации сети, 22 – поворот в сторону вибрации сети, 23 – ожидание жертвы (паук сидит в центре сети), 24 – питание, 25 – оплетение жертвы паутиной, 26 – перенос жертвы в центр сети, 27 – спрыгивание с сети, 28 – «ожидание действия яда», 29 – прижатие жертвы к хелицерам (предположительно, введение яда), 31 – чистка тела и конечностей, 32 – брачное поведение и спаривание, 33 – отсутствие паука на сети (фиксировалось только если паук находился рядом с сетью), 34 – передвижение по сети (не связанное с строительством), 35 – защита кокона (паук сидит на коконе или под ним), 36 – создание кокона. Статистический анализ данных проводился в программе PAST [7].

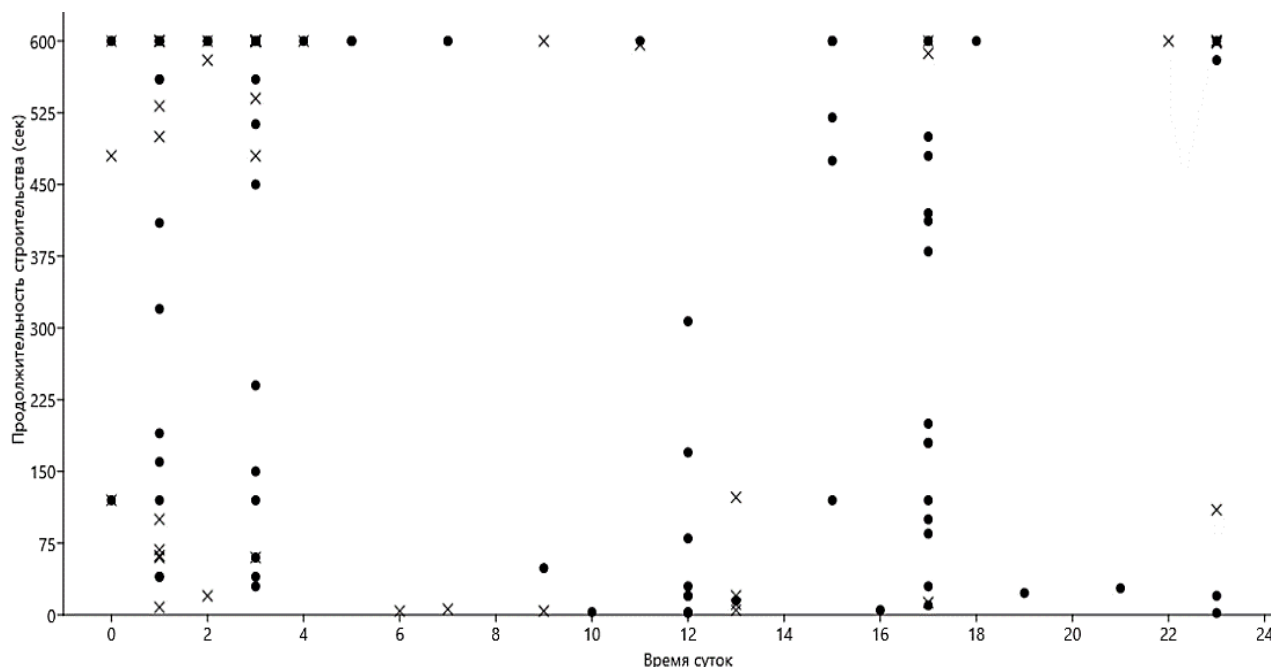
В целом, поведение *M. acalypha* и *C. conica* довольно схоже. Различия заключаются лишь в том, что все экземпляры вида *C. conica* приступали к питанию сразу после поимки жертвы, в отличие от представителей вида *M. acalypha*. У последних несколько раз было зафиксировано, что паук, после поимки жертвы и оплетения ее паутиной, возвращался на некоторое время в центр сети (от 3 до 580 секунд). После паук возвращался к жертве и приступал к питанию. Данный вид поведения был условно назван «ожидание действия яда».

Помимо этого, за период наблюдений не было зафиксировано чтобы *C. conica* откладывала кокон, а у *M. ascalypha* откладка была зафиксирована дважды.

Наиболее частыми актами у обоих видов являются ожидание попадания в сеть жертвы ($N = 377$) и движение паука к месту вибрации ($N = 111$). Редкими актами поведения являются: чистка сети ($N = 9$), строительство стабилимента ($N = 7$), создание вибрации на сети ($N = 7$). Строительство центральной зоны было зафиксировано лишь три раза, по причине краткосрочности данного акта поведения. Ремонт сети также был зафиксирован лишь трижды. Следует отметить, что пауки ремонтировали сеть только в том случае, если нарушались ее форма или крепление. Помимо этого, к редким актам поведения относятся брачное поведение и спаривание ($N = 3$), поведение, связанное с созданием кокона и его защитой ($N = 2$, $N = 17$ соответственно). Несмотря на то, что защита кокона была зафиксирована 17 раз, ранее уже упоминалось что это относилось лишь к 2 экземплярам. Остальные акты поведения были зафиксированы от 10 до 70 раз.

Самыми продолжительными (в секундах) актами поведения являются ожидание жертвы ($551,2 \pm 6,7$), питание ($515,7 \pm 17,2$), акты, связанные со строительством сети ($385,7 \pm 20,9$), брачным поведением (320 ± 140), созданием кокона и его защитой (600), а также отсутствие паука на сети ($484,9 \pm 26,3$).

Строительство сети является довольно длительным процессом в любое время суток (рис.). Наибольшая вариабельность продолжительности строительства наблюдается с 1 до 3 часов ночи у обоих видов, в 12 часов дня и 5 часов вечера у *M. ascalypha*. Сильное варьирование продолжительности актов строительства ночью объясняется тем, что оба вида пауков обязательно перестраивали сети в ночное время вне зависимости от состояния сети. Также следует отметить, что ночное строительство часто сопровождалось перерывами. Строительство сети днем встречалось реже и осуществлялось лишь в том случае, если сеть была сильно разрушена в результате внешнего воздействия. При этом из всех проанализированных экземпляров у *C. conica* строительство сети днем было зафиксировано только один раз, в то время как *M. ascalypha* чаще перестраивает повреждённую сеть днем.



Распределение продолжительности актов строительства сети по времени у *C. conica* (кресты) и *M. ascalypha* (точки)

В заключение можно сказать, *C. conica* и *M. ascalypha* имеют круглосуточную активность и большую часть времени проводят на сети в ожидании жертвы. Оба вида перестраивают сети ночью, вне зависимости от состояния сети. Если сеть оказывается сильно повреждена в

дневное время, паук может перестроить ее еще раз. Особенно хорошо это поведение выражено у *M. ascalypha*, что делает ее более подходящим объектом в исследованиях по биоиндикации.

Список цитируемой литературы

1. Марусик Ю.М., Ковблюк Н.М. Пауки Сибири и Дальнего Востока России. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. 344 с.
2. Карташев А.Г., Карташева А.А. Структура ловчих сетей пауков-кругопрядов: моногр. Томск: Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники, 2009. 120 с.
3. Ажеганова Н.С. Краткий определитель пауков (Aranei) лесной и лесостепной зоны СССР. Ленинград: Академия наук СССР, 1968. 152 с.
4. Punda H. Pająki Borów Sosnowych. Warszawa: Polska Akad. Nauk, 1975. 91 pp.
5. Dondale C.D., Redner J.H., Paquin P., Levi H.W. The insects and arachnids of Canada. Part 23. The orb-weaving spiders of Canada and Alaska (Araneae: Uloboridae, Tetragnathidae, Araneidae, Theridiosomatidae). Ottawa: NRC Research Press, 2003. 371 pp.
6. Esyunin S.L., Laetin A.M., Tselishcheva L.G., Lyapunov A.N., Tiunov A.V. On the spider fauna (Arachnida: Aranei) of Kirov Area, Russia // *Arthropoda Selecta*. 2011. Vol. 20, № 4: 283–318.
7. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // *Palaeontologia Electronica*. 2001. Vol. 4, № 1. P. 9.

ВЛИЯНИЕ КДО НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ РЖИ И ЛЮПИНА

Фофанова Ю.С., Кайгородов Р.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: кородревесные отходы, короотвалы, фитотестирование, ростовые процессы

Кородревесные отходы (КДО) формируются в результате деятельности целлюлозно-бумажной промышленности и состоят из древесных частиц различного размера, степени и характера разложения в сочетании с перегноем [1].

Основная проблема КДО в том, что они практически не утилизируются и в основном складываются на короотвалах, что негативно сказывается на окружающей среде. Короотвалы занимают большие площади, имеют повышенную пожароопасность и при их самовозгорании и тлении выделяются опасные для человека вещества (например, бенз(а)пирен) [2,3]. Кроме того, массовые схроны КДО загрязняют водные бассейны веществами и продуктами распада коры [4,5]. Несмотря на это, КДО обладают хорошими агротехническими свойствами и могут использоваться для создания органоминеральных субстратов, используемых при рекультивации нарушенных земель [6].

Цель работы заключается в изучении степени влияния КДО на ростовые процессы люпина и ржи для оценки перспективы и эффективности использования КДО в качестве удобрения, как одного из способов переработки и утилизации.

В настоящей работе были поставлены задачи проведения фитотестирования на субстрате с добавлением КДО, а также сбор данных, анализ и оценка воздействия кородревесных отходов на рост люпина и ржи. В качестве объектов исследования выступили грунты, состоящие из песка с добавлением разной доли КДО с размером фракции менее 1 мм в диаметре. В первом варианте было внесено 10% КДО, во втором – 25% КДО. В качестве тест-объектов выступили: люпин белый (*Lupinus albus* L.) из семейства бобовых, отличающийся, как известно, особым азотным обменом из-за симбиоза с клубеньковыми бактериями [7], по 12 шт./вариант и рожь посевная сорта «Фаленская-4» (*Secale cereale* L.) по 50 шт./вариант.

Подготовка КДО осуществлялась путём просеивания через сито диаметром 1 мм, для удаления крупных частиц. Все варианты поливались равным количеством дистиллированной воды. Эксперимент длился 14 суток с момента посадки в исследуемые субстраты тест-объектов. На 3, 7, 10 и 14 сутки проводили измерение длины надземной части проростков. Обработка полученных результатов происходила с помощью методов стандартной статистики в программе «Past 3/16». Достоверность эксперимента подтверждена критерием Стьюдента при условии, что $t_{расч} \geq t_{ст}$. Значимость различий между вариантами эксперимента доказывали по критерию Фишера, при условии $F_{расч} \geq F_{ст}$ и по значению наименьшей существенной разности (НСР) на 5% уровне вероятности.

Полученные данные представлены в таблицах 1 и 2. В результате анализа динамики роста ржи (см. табл. 1) было выявлено, что на 3 сутки проростки в варианте «КДО 10%» были выше контроля на 42%, а «КДО 25%» на 27%. В то же время вариант «КДО 10%» оказался выше «КДО 25%» на 12%. На последующих этапах эксперимента (3, 7 и 14 сутки) длина проростков ржи была также достоверно выше на варианте «КДО 10%».

Положительное влияние КДО на рост растений связан с оптимизацией агрохимических, агрофизических свойств, а также с повышением биологической активности минерального субстрата. Данные по исследованиям свойств субстрата при внесении КДО в настоящей статье не приводятся.

Таблица 1 – Динамика роста ржи при различных концентрациях КДО

Динамика роста ржи, см									
Вариант	3 сутки (11.06.2021)	$t_{расч}$	7 сутки (15.06.2021)	$t_{расч}$	10 сутки (18.06.2021)	$t_{расч}$	14 сутки (22.06.2021)	$t_{расч}$	$t_{ст}$
Контроль	19,26±1,68	11,46	91,91±7,37	12,48	108,48±9,77	11,11	125,00±9,85	15,26	2,04
КДО 10%	27,30±1,92	14,22	122,51±6,29	19,47	137,97±7,12	19,37	143,83±7,58	24,36	
КДО 25%	24,38±1,48	16,48	100,00±6,88	14,56	116,58±8,18	14,25	128,80±8,07	23,80	
$F_{расч}$	4,81		4,84		3,02		1,11		
$F_{ст}$	1,60		1,39		1,60		1,60		
НСР	5,36		20,87		23,33		23,26		

В ходе исследования динамики роста люпина (см. табл. 2) было определено, что на 3 сутки проростки в варианте «КДО 10%» были выше контроля на 74%, а «КДО 25%» на 132%. Вместе с тем вариант «КДО 25%» оказался выше «КДО 10%» на 34%. На последующих этапах эксперимента варианты «КДО 10%» и «КДО 25%» также достоверно отличались высотой проростков от контроля, при этом между собой достоверных отличий не проявляли.

Таблица 2 – Динамика роста люпина при различных концентрациях КДО

Динамика роста люпина, см							
Вариант	7 сутки (15.06.2021)	$T_{расч}$	10 сутки (18.06.2021)	$T_{расч}$	14 сутки (22.06.2021)	$T_{расч}$	$T_{ст}$
Контроль	20,42±2,34	8,71	62,75±7,25	8,66	111,82±9,06	12,34	2,26
КДО 10%	35,50±5,16	6,87	82,73±6,13	13,5	126,10±5,49	22,99	
КДО 25%	47,45±3,57	13,31	81,10±4,11	19,72	127,60±5,77	22,13	
$F_{расч}$	12,00		3,37		1,54		
$F_{ст}$	1,89		1,89		1,89		
НСР	12,44		18,85		22,10		

Таким образом, оценив динамику роста ржи и люпина, можно сказать, что добавление КДО способствовало улучшению агрохимических свойств субстрата. Вместе с тем для ржи более оптимальным оказалось 10%-е соотношение КДО к субстрату. При большем добавлении коры, показатели роста снизились на 12%. Наряду с этим для люпина наиболее благоприятным стало 25%-е соотношение КДО к субстрату. Однако разница между 10% и 25% соотношением не такая значительная. Это даёт возможность предположить, что для люпина и других бобовых растений, будет достаточно среднего добавления коры, в примерном соотношении 17%.

Список цитируемой литературы

1. Ерунцова Е. Р., Анчугова Е. М. Кордревесные отходы: накопление и пути утилизации // Актуальные проблемы биологии и экологии: Материалы докладов XXVII Всероссийской молодежной научной конференции (с элементами научной школы), Сыктывкар, 16–20 марта 2020 года / Отв. редактор С. В. Дегтева. Сыктывкар: Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 2020. С. 106-108.
2. Воробьева Д.Н. Оценка потенциального плодородия субстратов из твердых отходов целлюлозно бумажной промышленности для использования в лесовыращивании: дис. ... канд. биол. наук. М., 2015. 202 с.
3. Беседина И.Н., Симкин Ю.Я., Петров В.С. Получение углеродных материалов из отходов окорки лиственницы сибирской. Получение активных углей // Химия растительного сырья. 2002. № 2. С. 80–91.
4. Monte M. C. [et al.]. Waste management from pulp and paper production in the European Union// Waste Management and Research. 2009. Vol. 29. P. 293-308.
5. Крылов, В. А. Решение экологических проблем – переработка короотвалов ЦБК и других древесных отходов в твердое биотопливо // Возобновляемая энергетика на Северо-Западе России: сб. докл. Междунар. конгр. «Дни чистой энергии в Петербурге, 2010» / под общ. ред. В. В. Елистратова. СПб., 2010. 144 с
6. Вайсман Я.И., Коротаев В.Н. Компостирование твердых органических отходов производства и потребления. Вермикомпостирование: моногр. / под ред. Я.И. Вайсмана. Пермь: Изд-во Перм. гос. техн. ун-та, 2010. 557 с.
7. Van de Velde W., Guerra J.C.P., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., Mergaert P., Kondorosi E., Holsters M., Goormachtig S. Aging in Legume Symbiosis. A Molecular View on Nodule Senescence in *Medicago truncatula* // Plant Physiology: Journal American Society of Plant Biologists, 2006. Vol. 141, №. 2. P. 711-720.

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЁРЕН ДЛЯ АЭРОПАЛИНОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА С ПОМОЩЬЮ ГЛУБОКИХ ГЕНЕРАТИВНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ

Ханжина Н.Е.¹, Новоселова Л.В.²

¹ Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: поллиноз, пыльца, распознавание изображений, генерация изображений

Поллиноз, или пыльцевая аллергия – заболевание, которому подвержено более 20% населения Европы [1, 2, 3]. Для помощи больным в некоторых регионах производится сезонный пыльцевой мониторинг воздуха [4-11].

Однако, существующая сеть станций мониторинга не способна обеспечить больных ежедневной информацией о наличии аллергенной пыльцы, что приводит к серьезным экономическим и социальным издержкам [12]. Более того, территориальные различия пыльцевого спектра затрудняют свободное передвижение больных между регионами [13]. Таким образом, требуется агрегация информации и глобальная оценка проблемы [11, 14].

Анализ пыльцы, который производится палинологами на станциях пыльцевого мониторинга, включает в себя определение видов растений по их пыльце с помощью микроскопа. Этот процесс крайне трудоемкий и занимает до четверти времени всего пыльцевого анализа, что не позволяет обеспечить больных поллинозом релевантной информацией [13, 15]. Решение этой проблемы может быть достигнуто путем автоматизации процесса распознавания, что позволит своевременно предупреждать больных о необходимости начала лечения симптомов. Распознавание пыльцы с микроскопа можно формализовать как задачу распознавания изображений. В настоящее время глубокие нейронные сети эффективно решают задачу распознавания изображений.

Проблема автоматизации распознавания пыльцы была впервые выявлена в 1968 г. [16]. С тех пор исследователи по всему миру предпринимают попытки решить задачу с помощью различных методов. Многие выделяют узконаправленные признаки пыльцевых зерен, направленные на их природу, такие как форма, размеры, объем, периметр, текстурные признаки, апертуры [17–22], и строят на их основе стандартные модели машинного обучения: метод опорных векторов, линейный дискриминантный анализ, случайный лес, нейросети, k -ближайших соседей и др.

Успех в решении этой проблемы в значительной степени коррелирует с развитием программного и аппаратного обеспечения для глубокого обучения и компьютерного зрения [23], а также доступности GPU серверов и открытых передовых моделей. Несмотря на популярность и эффективность методов глубокого обучения, их применимость к задаче распознавания пыльцы впервые была исследована в работе [24]. Последующие результаты исследований по этой теме целиком лежат в области глубокого обучения [25–33].

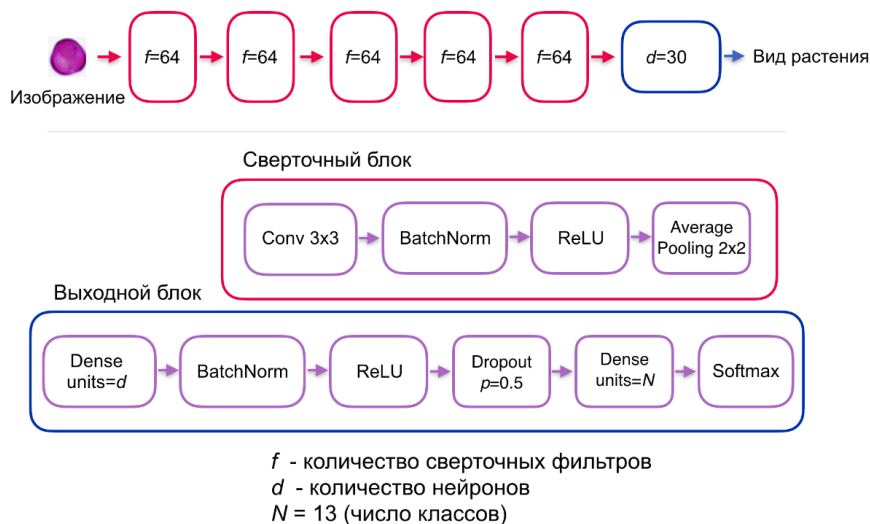
В работах [25–29], авторы адаптировали существующие современные сверточные нейронные сети (СНС) для классификации пыльцы, такие как VGG-16 [30], AlexNet [23], DenseNet [31]. В работах [24, 32–33] авторы строили свои собственные легковесные CNN с более низкой производительностью. В лучших работах используются слишком глубокие архитектуры, которые чрезмерны для этой проблемы и требуют большого количества данных для обучения. В то же время проблемой является отсутствие больших открытых наборов данных для обучения. Существующие открытые наборы данных [21,34,35] невелики и представляют разные домены, поэтому их объединение не тривиально.

В данном исследовании используется новый пыльцевой набор данных, который доступен онлайн и включает в себя более 5100 пыльцевых зерен 13 видов растений, таким образом, это самый большой открытый набор изображений аллергенной пыльцы (<https://www.kaggle.com/nataliakhanzhina/pollen20ldet>). Однако, этого объема данных недостаточно для эффективного обучения глубоких нейронных сетей, что чревато переобучением моделей. Для борьбы с этим в работе предлагается использовать генеративные нейронные сети (ГНС) для генерации искусственных изображений для предобучения нейросетевого классификатора. На основе обученного классификатора разработан веб-сервис автоматического распознавания пыльцы, доступный палинологам по ссылке <https://pollen-analyst.ru/> по запросу.

В качестве ГНС в работе используется архитектура StyleGAN [36]. StyleGAN [36] является одной из самых передовых генеративных состязательных сетей для генерации изображений. Новизна и преимущество этой модели заключается в ее генераторе, который

унаследовал генератор Progressive GAN [37], улучшив его адаптивной нормализацией экземпляров [38], отвечающую за передачу стиля.

В качестве классификатора используется собственная архитектура сверточной нейронной сети, представленная на рисунке. Она содержит 5 сверточных блоков с двумя последующими полносвязными слоями, использует функцию активации softmax и обучается с категориальной перекрестной энтропией в качестве функции потерь.



Архитектура сверточной нейронной сети для классификации пылцы

Описанная модель была предварительно обучена на искусственных изображениях, сгенерированных StyleGAN. Было сгенерировано 5000 изображений каждого класса, всего 65000 изображений. Модель была обучена на них с помощью оптимизатора Adam со скоростью обучения, равной 10^{-2} и косинусной функцией расписания. Обучение модели заняло 350 эпох. Затем было выполнено обучение переносом на реальные данные с тем же оптимизатором, скоростью обучения равной 10^{-2} в течение 300 эпох с ранней остановкой. Наконец, была произведена тонкая настройка в течение еще 300 эпох с начальной скоростью обучения 10^{-2} и косинусной функцией расписания. Помимо этого, описанная СНС была также обучена с нуля на реальных изображениях.

Как видно из таблицы, модель СНС, предварительно обученная на изображениях StyleGAN превосходит все другие модели, достигая 97,7% F_1 меры. В общей сложности использование синтетических изображений позволяет увеличить показатель F_1 меры на 2,6%. Поскольку используемый набор данных ранее был закрытым, а существующие открытые наборы данных относятся к другим доменам, произвести прямое сравнение результатов с другими работами невозможно. Однако, по сравнению с наиболее близкими к настоящей работами [28, 29], данный результат превосходит их по задаче классификации.

Сравнение модели сверточной нейронной сети, обученной на исходном наборе данных (СНС) и предварительно обученной на искусственных изображениях, сгенерированных StyleGAN (СНС+StyleGAN) на тестовом множестве целевого набора данных пыльцевых зерен с оптического микроскопа

Модель	Точность, %	F_1 мера, %
СНС	96,392±0,003	95,067±0,010
СНС+StyleGAN	97,804±0,002	97,662±0,002

В этой работе представлены результаты решения проблемы автоматической идентификации пыльцы. Решение этой проблемы позволяет ускорить процесс мониторинга пыльцы, чтобы своевременно предупреждать больных, страдающих поллинозом, о пылении аллергенов. Для решения задачи классификации был применен подход, способный работать с небольшими данными, а именно, предобучение сверточной нейронной сети на искусственных изображениях, сгенерированных StyleGAN. Было обучено две разные модели: собственная небольшая сверточная нейронная сеть и она же, предварительно обученная на искусственных изображениях. Лучшей моделью оказалась предварительно обученная СНС, результат составил 97,66% F_1 меры. Лучшая модель была внедрена в разработанный онлайн-сервис; палинологи и другие специалисты могут получить доступ к нему, написав запрос авторам по электронной почте. В будущем веб-сервис будет интегрирован с информационными пыльцевыми службами для пациентов.

Список цитируемой литературы

1. Canonica G.W. et al. WAO White Book on Allergy // USA: World Allergy Organization. 2013.
2. Bousquet P.J. et al. Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I // *Allergy*. – 2007. – V. 62. – № 3. – P. 301–309.
3. Eigenmann P. A. et al. Testing children for allergies: why, how, who and when: an updated statement of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) Section on Pediatrics and the EAACI-Clemens von Pirquet Foundation // *Pediatric allergy and immunology*. – 2013. – T. 24. – №. 2. – C. 195-209.
4. Bousquet J. et al. MACVIA-ARIA Sentinel NetworK for allergic rhinitis (MASK-rhinitis): the new generation guideline implementation // *Allergy*. – 2015. – T. 70. – №. 11. – C. 1372-1392.
5. Chikhladze M. V., Khachapuridze D. R., Sepiashvili R. I. The use of the Burkhard Pollen Trap to study the aeroecological profile in Georgia // *International Journal on Immunorehabilitation*. – 2009. – T. 11. – №. 2. – C. 200.
6. Kishikawa R. et al. Japanese cedar airborne pollen monitoring by Durham's and burkard samplers in Japan-estimation of the usefulness of Durham's sampler on Japanese cedar pollinosis // *Global Environ Res*. – 2009. – T. 13. – C. 55 - 62.
7. Puc M. et al. Birch pollen grains without cytoplasmic content in the air of Szczecin and Bialystok // *Alergoprofil*. – 2016. – T. 12. – №. 2. – C. 101-105.
8. Piotrowska-Weryszko K. et al. Mugwort pollen season in southern Poland and Lviv (Ukraine) in 2015 // *Alergoprofil*. – 2016. – T. 12. – №. 1.
9. Giorato M. et al. Airborne pollen in Padua (NE-Italy): A comparison between two pollen samplers // *Aerobiologia*. – 2003. – T. 19. – №. 2. – C. 129-131.
10. Sofiev M., Bergmann K. C. (ed.). Allergenic pollen: a review of the production, release, distribution and health impacts. – 2012. – P. 71–127.
11. Novoselova L.V., Minaeva N. Pollen monitoring in Perm Krai (Russia)-experience of 6 years // *Acta Agrobotanica*. – 2015. – V. 68. – № 4. – P. 343-348.
12. 3. D'Amato G., Cecchi L., Liccardi G. Thunderstorm-related asthma: not only grass pollen and spores // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2008. – V. 121. – № 2. – P. 537.
13. Sikoparija B. et al. Spatial and temporal variations in airborne Ambrosia pollen in Europe // *Aerobiologia*. – 2017. – V. 33. – N 2. – P. 181–189.
14. Pfaar O. et al. Definition von Pollenexpositionszeiten für klinische Studien zur Allergen-Immuntherapie bei polleninduzierter Rhinokonjunktivitis—ein EAACI-Positionspapier // *Allergologie*. – 2018. – V. 41. – N 9. – P. 386.
15. Holt K.A., Bennett K.D. Principles and methods for automated palynology // *New Phytologist*. – 2014. – V. 203. – N 3. – P. 735–742.
16. Flenley J.R. The problem of pollen recognition // *Problems in Picture Interpretation*, Clowes MB, Penny JP (eds). CSIRO: Canberra. – 1968. – P. 141–145.

17. Boucher A. et al. Development of a semi-automatic system for pollen recognition // *Aerobiologia*. – 2002. – V. 18. – № 3. – P. 195–201
18. Chen C. et al. Feasibility study on automated recognition of allergenic pollen: grass, birch and mugwort // *Aerobiologia*. – 2006. – V. 22. – № 4. – P. 275–284.
19. Ronneberger O., Schultz E., Burkhardt H. Automated pollen recognition using 3D volume images from fluorescence microscopy // *Aerobiologia*. – 2002. – V. 18. – № 2. – P. 107–115.
20. Chica M. Authentication of bee pollen grains in bright-field microscopy by combining one-class classification techniques and image processing // *Microscopy research and technique*. – 2012. – V. 75. – № 11. – P. 1475–1485.
21. Chudyk C. et al. Development of an automatic pollen classification system using shape, texture and aperture features // *LWA 2015 Workshops: KDML, FGWM, IR, and FGDB*. – 2015. – P. 65–74.
22. Khanzhina N., Putin E. Pollen recognition for allergy and asthma management using gist features // *International Conference on Digital Transformation and Global Society*. Springer, Cham. – 2016. – P. 515–525.
23. Krizhevsky A., Sutskever I., Hinton G. E. Imagenet classification with deep convolutional neural networks // *Advances in neural information processing systems*. – 2012. – T. 25. – C. 1097–1105.
24. Khanzhina N. et al. Pollen grain recognition using convolutional neural network // *ESANN 2018- Proceedings, European Symposium on Artificial Neural Networks, Computational Intelligence and Machine Learning*. – 2018. – C. 409–414.
25. Daoud A., Ribeiro E., Bush M. Sequential recognition of pollen grain Z-stacks by combining CNN and RNN // *The Thirty-First International Flairs Conference*. – 2018. – P. 8–13.
26. Sevillano V., Aznarte J. L. Improving classification of pollen grain images of the POLEN23E dataset through three different applications of deep learning convolutional neural networks // *PloS one*. – 2018. – T. 13. – № 9. – C. 1–18.
27. Sevillano V., Holt K., Aznarte J. L. Precise automatic classification of 46 different pollen types with convolutional neural networks // *Plos one*. – 2020. – T. 15. – № 6. – C. 1–15.
28. de Geus A. R. et al. Large-scale pollen recognition with deep learning // *2019 27th European Signal Processing Conference (EUSIPCO)*. – IEEE, 2019. – C. 1–5.
29. Gallardo-Caballero R. et al. Precise pollen grain detection in bright field microscopy using deep learning techniques // *Sensors*. – 2019. – T. 19. – № 16. – C. 3583.
30. Simonyan K., Zisserman A. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition // *arXiv preprint arXiv: 1409. 1556*. – 2014.
31. Huang G. et al. Densely connected convolutional networks // *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*. – 2017. – C. 4700–4708.
32. Menad H., Ben-Naoum F., Amine A. Deep Convolutional Neural Network for Pollen Grains Classification // *JERI*. – 2019. – C. 1–10.
33. Schiele J. et al. Automated classification of airborne pollen using neural networks // *2019 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. – IEEE, 2019. – C. 4474–4478.
34. Astolfi G. et al. POLLEN73S: An image dataset for pollen grains classification // *Ecological Informatics*. – 2020. – T. 60. – C. 101165.
35. Goncalves A. B. et al. Feature extraction and machine learning for the classification of Brazilian Savannah pollen grains // *PloS one*. – 2016. – T. 11. – № 6. – C. 1–20.
36. Karras T., Laine S., Aila T. A style-based generator architecture for generative adversarial networks // *Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. – 2019. – C. 4401–4410.
37. Karras T. et al. Progressive Growing of GANs for Improved Quality, Stability, and Variation // *International Conference on Learning Representations*. – 2018. – C. 1–26.
38. Huang X., Belongie S. Arbitrary style transfer in real-time with adaptive instance normalization // *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision*. – 2017. – C. 1501–1510.

ВЛИЯНИЕ ИНДОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ФАКТОРОВ СТРЕССОРНОГО ОТВЕТА *ESCHERICHIA COLI*

Хаова Е.А.^{1,2}, Кашеварова Н.М.², Ткаченко А.Г.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

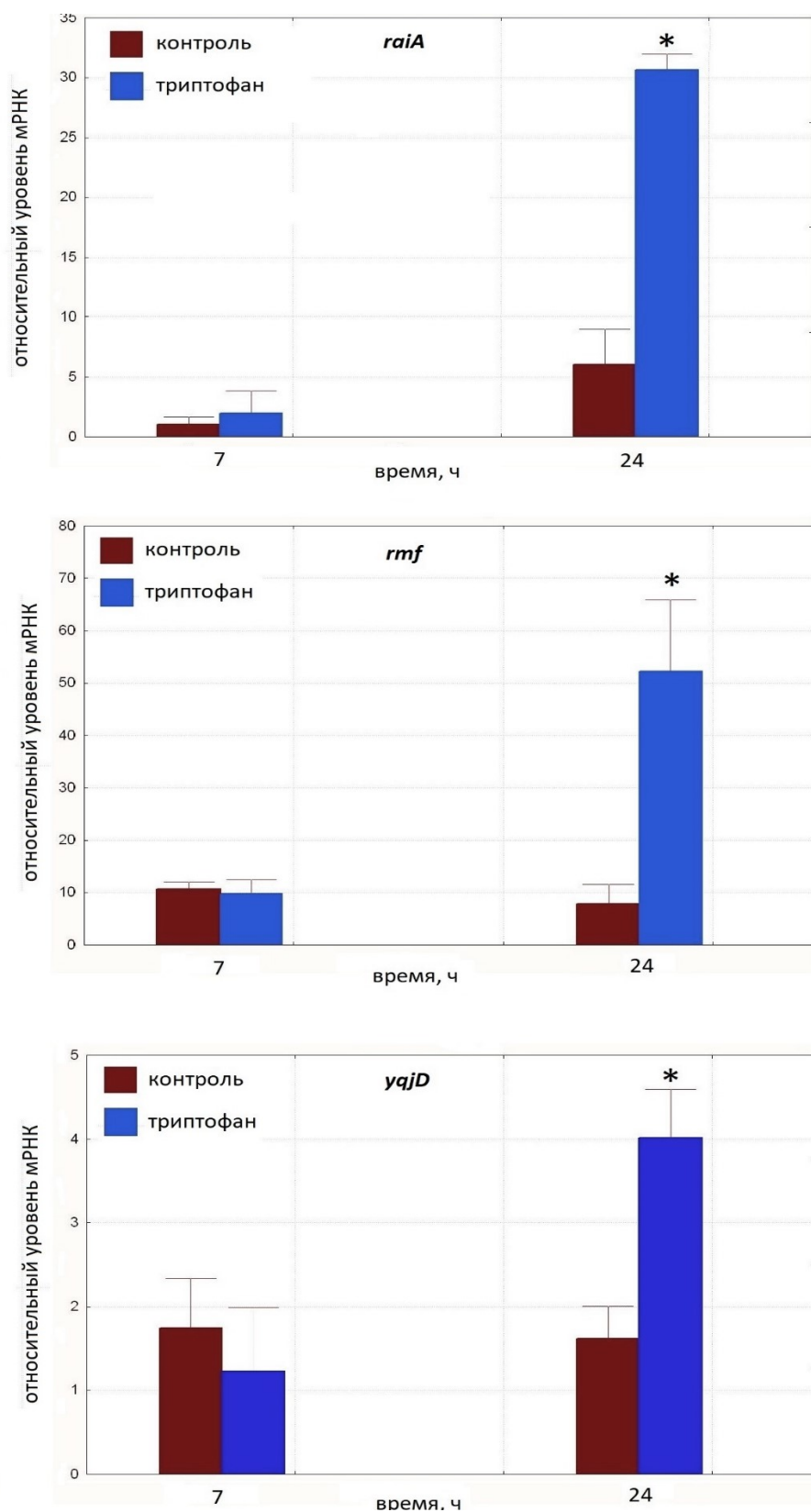
Ключевые слова: индол, стресс, генная экспрессия, *Escherichia coli*

Индол присутствует в значительных количествах в кишечном тракте млекопитающих, в том числе человека. Данное соединение продуцируется многими грамположительными и грамотрицательными бактериями, включая *Escherichia coli*. Индол функционирует в качестве сигнальной молекулы, передающей сигнал клетке из внешней среды и запускающий каскад реакций, направленный на оптимальное реагирование на изменения в окружающей среде. Благодаря тому, что индол способен пассивно диффундировать через цитоплазматическую мембрану, данная сигнальная молекула участвует во внутри-, межвидовом, а также в межцарственном взаимодействии. Известно, что индол оказывает множество различных эффектов на метаболизм и физиологию, участвует в адаптации к стрессу, биопленкообразованию, антибиотикорезистентности, бактериальной персистенции. Однако молекулярные мишени и механизм действия данного метаболита до сих пор слабо изучены [1, 2, 3]. Нами исследовано влияние индола на экспрессию ряда факторов, участвующих в адаптации *E. coli* к стрессу. Среди них гены *relA* и *spoT*. *relA* кодирует (p)ppGpp-синтезу, *spoT* – (p)ppGpp-синтезу/гидролазу. (p)ppGpp (гуанозинтетра(пента)фосфат) относят к классу алармонов, сигналов стресса. В бактериальных клетках он выполняет функции глобального регулятора стринджен-ответа. RelA реагирует на связывание с рибосомой незаряженной тРНК, т. е. на аминокислотное голодание, а SpoT – на отклонение скорости трансляции от максимальной, т.е. реагирует на голодание и другие стрессы. (p)ppGpp регулирует множество клеточных процессов, его действие направлено на избежание напрасной траты ресурсов в условиях стресса и на формирование дормантного состояния. [4]. Под его контролем находится экспрессия гена *rpoS* [5], который кодирует альтернативную σ^S -субъединицу РНК-полимеразы. В свою очередь, гены, промоторы которых имеют сродство к данной σ -субъединице, составляют *rpoS*-регулон, ответственный за адаптацию энтеробактерий к комплексному стрессорному воздействию в стационарной фазе [6, 7]. Кроме того, в данной работе исследованы уровни экспрессии генов-паралогов *hns* и *stpA*, кодирующих ДНК-связывающие белки, выполняющие функции глобальных транскрипционных регуляторов [8, 9], а также генов *rmf*, *hpf*, *raiA*, *rsfS*, *sra*, *yqjD*, *ettA*, кодирующих факторы гибернации рибосом, ответственных за ингибирование трансляции в условиях стрессорных воздействий [10].

Исследования проводили на штамме BW25141 *Escherichia coli* на минимальной среде M9 (+0,4% глюкоза) без добавления и с добавлением триптофана 2мМ на 0 ч культивирования. Концентрацию индола в среде определяли методом ВЭЖХ. Экспрессию генов исследовали методом ПЦР в реальном времени, сопряженной с обратной транскрипцией.

Результаты исследования показывают, что экзогенный триптофан конвертируется в эквивалентное количество индола на 24 ч культивирования во время стационарной фазы. Согласно полученным данным, в течение 7 ч культивирования концентрация индола в среде с добавкой триптофана находится на низком уровне, сходном с контролем, однако резко возрастает на 24 ч. Полученные результаты согласуются с данными литературы [2, 11]. Известно, что реакция образования индола из триптофана у *E. coli* катализируется ферментом триптофаназой TnaA. Экспрессия *tnaA* находится под строгим контролем RpoS и происходит в стационарной фазе.

Наибольшая активность триптофаназы в стационарной фазе подтверждает участие индола в адаптации к стрессам [2]. Внутриклеточная концентрация индола *E. coli*, культивируемой на полноценной среде, значительно возрастает при переходе в стационарную фазу роста, достигая 60 мМ [11], и может быть ответственной за индукцию экспрессии факторов адаптации к стрессу.



Возрастание экспрессии генов *raiA*, *rmf*, *yqjD* при увеличении количества индола

Нами исследована экспрессия перечисленных выше генов на 7 ч и 24 ч культивирования, то есть до начала и в момент возрастания уровня индола в опытных образцах. Полученные результаты не показали статистически значимых различий в транскрипционной активности изучаемых генов, наблюдаемой на 7 ч культивирования между контрольными пробами и пробами с добавлением триптофана. Однако на 24 ч культивирования, когда происходит накопление индола в клетках с последующим его выходом в среду, наблюдается достоверная стимуляция экспрессии генов *raiA*, *rmf*, *yqjD* (рис. 1), тогда как экспрессия гена *relA* существенно снижается. Полученные данные относительно остальных изучаемых генов (*spoT*, *rpoS*, *hns*, *stpA*, *hpf*, *rsfS*, *sra*, *ettA*) статистически достоверных различий с контролем не показали.

Таким образом, при переходе клеток *E. coli* в стационарную фазу происходит эквивалентная конвертация экзогенного триптофана во внутриклеточный индол за счет активности триптофаназы. В этот период происходит стимуляция экспрессии факторов гибернации рибосом, основным предназначением которых является снижение активности трансляционных процессов и формирование персистерного состояния как механизма адаптации *E. coli* к стрессам стационарной фазы. Возрастание содержания индола в клетках впоследствии сменяется его выходом в среду. Полученные результаты и данные литературы дают основание для более глубокого изучения роли индола и факторов гибернации рибосом в бактериальной персистенции, которая рассматривается как одна из причин рецидивов инфекционных заболеваний.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-73-10156

Список цитируемой литературы

1. Zarkan A., Liu J., Matuszewska M., Gaimster H., Summers D.K. Local and universal action: The paradoxes of indole signalling in bacteria//Cell Press. Trends in Microbiology. – 2020. – V. 28. – №7. – P. 566 -577.
2. Li G., Young K.D. Indole production by the tryptophanase TnaA in *Escherichia coli* is determined by the amount of exogenous tryptophan//Microbiology. – 2013. – V. 159. – №2. P. 402-410.
3. Lang M., et al. Sleeping ribosomes: bacterial signaling triggers RaiA mediated persistence to aminoglycosides//Cell Press. – 2021. – V. 24. – №10. – P. 1-15.
4. Hauryliuk V., Atkinson G., Murakami K., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology//Nature Reviews. Microbiology. – 2015. – V. 13. – №5. – P. 1-12.
6. Bougdour A., Gottesman S. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP//PNAS. – 2007. – V. 104. – №31. – P. 12896 -12901.
7. Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma (S) (RpoS) subunit of RNA polymerase//Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2002. – V. 66. – №3. – P. 373 -395.
8. Hengge-Aronis R. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ^S -selective? // Current Opinion in Microbiology. – 2002. – V. 5. – №6. – P. 591 -595.
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. 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.
11. Prossliner T., Winther K.S., Sorensen M.A., Gerdes K. Ribosome hibernation//The Annual Review of Genetics. – 2018. – V. 52. – №48. – P. 321-350.
12. Gaimster H., Cama J., Hernandez-Ainsa S., Keyser U.F., Summers D.K. The indole pulse: a new perspective on indole signalling in *Escherichia coli*//PLOS. – 2014. – V. 9. – № 4. – P. 1-7.

НАНОЧАСТИЦЫ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ: СИНТЕЗ, КОНТРОЛЬ РАЗМЕРОВ И ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ МЕТОК В ИММУНОАНАЛИЗЕ

Храмцов П.В.^{1,2}, Кропанева М.Д.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: берлинская лазурь, наночастицы, желатин, иммуноферментный анализ

В настоящее время усилия множества исследователей по всему миру направлено на разработку искусственных аналогов биологических молекул, в том числе и ферментов. Причиной этого являются как недостатки ферментов, ограничивающие возможности их применения, так и стремление настраивать каталитические и физико-химические свойства ферментов под определенные задачи, что весьма непросто при работе с биомолекулами ввиду их склонности к денатурации и потере активности в условиях отличных от оптимальных. Пероксидазы являются классом ферментов, который, пожалуй, наиболее активно пытаются имитировать. Во многом это связано с их широким использованием в терапии, клинической лабораторной диагностике [1], очистке окружающей среды от загрязнений [2], а также синтезе полимеров. Одним из таких ферментов является пероксидаза хрена. Пероксидаза из корней хрена это один из двух (наряду со щелочной фосфатазой) популярных ферментов, которые исполняют роль метки в иммуноферментном анализе [1]. Улучшение свойств пероксидазы хрена или использование более совершенных аналогов может, соответственно, в перспективе может позволить увеличить стабильность и чувствительность тест-систем, а также снизить их стоимость.

Берлинская лазурь является координационным соединением железа, которое обладает высокой каталитической активностью, подобной таковой пероксидазы хрена [3]. Мы исследовали возможность использования наночастиц из берлинской лазури в качестве альтернатив пероксидазе из природных источников. В ходе выполнения работы были разработаны способы синтеза наночастиц берлинской лазури с регулируемым размером, произведено 30-кратное масштабирование синтеза наночастиц, исследованы их стабильность, каталитические и физико-химические свойства. На основе наночастиц берлинской лазури, стабилизированных слоем желатина, синтезированы диагностические реагенты, с помощью которых произведен количественный анализ иммуноглобулинов человека и онкомаркера (простатспецифического антигена).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 20-75-00029.

Список цитируемой литературы

1. Wu L., Li G., Xu X., Zhu L., Huang R., Chen, X. Application of nano-ELISA in food analysis: Recent advances and challenges // TrAC – Trends in Analytical Chemistry. – 2019. – V. 113. – P. 140-156.
2. Twala P.P., Mitema A., Baburam C., Feto N.A. Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin // AIMS Microbiology. – 2020. – V. 6. – № 3. – P. 330-349.
3. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. Catalytically Synthesized Prussian Blue Nanoparticles Defeating Natural Enzyme Peroxidase // Journal of the American Chemical Society. – 2018. – V. 140. – № 36. – P. 11302-11307.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ЭРОГОРГИАЕНА ПРОТИВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК В СРАВНЕНИИ С ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ПЕРВОГО РЯДА

Цыганов И.В.^{1,2}, Сидоров Р.Ю.^{1,2}, Нестерова Л.Ю.^{1,2}, Ткаченко А.Г.^{1,2}

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

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: биопленкообразование, антибиотики, *Mycolicibacterium smegmatis*.

Одним из наиболее эффективных механизмов, способствующих выживанию бактерий в природе, является их способность формировать биопленочные сообщества [1] за счет синтеза матрикса биопленки, составляющего их структурную основу и выполняющего роль защитного барьера от стрессорных воздействий внешней среды или иммунных факторов макроорганизма [2][3]. Клетки в таких сообществах фенотипически отличаются от свободно живущих планктонных форм замедленной скоростью пролиферативных и метаболических процессов [4], что способствует формированию у них персистерного состояния [5], повышающего толерантность к антибиотикам и стрессам [6]. Таким образом, способность бактерий к формированию биопленок снижает эффективность лечения бактериальных инфекций, что создает дополнительные проблемы для здравоохранения, в особенности в борьбе с социально значимыми заболеваниями, лидером среди которых по заболеваемости и смертности является туберкулез [7]. Туберкулезная инфекция характеризуется затяжным течением, обусловленным повышенной способностью возбудителя – *Mycobacterium tuberculosis* – к образованию биопленок и формированию персистеров. Это снижает эффективность клинических антитуберкулезных антибиотиков, действующих на растущие клетки, но не проявляющие активности в отношении покоящихся форм [8]. Поэтому разработка новых лекарственных средств, нацеленных на противодействие процессам образования биопленок и формирования персистенции, является перспективным направлением в борьбе с бактериальными инфекциями.

Известно, что ключевыми регуляторами, под контролем которых у бактерий находятся оба эти процесса, является алармон гуанозинтетрафосфат (p)ppGpp, уровень которого в клетках, в свою очередь, регулируется алармон синтетазами. Сотрудниками лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН ранее было показано, что микобактериальные алармон синтетазы Rel_{msm} и RelZ являются мишенью для нового антибиотика 4-(4,7-диметил-1,2,3,4-тетрагидро-нафталин-1-ил) пентановой кислоты (DMNP) [9]. Данное соединение является синтетическим аналогом природного антибиотика (–)-эрогоргияена [10] и было синтезировано сотрудниками Пермского национального исследовательского университета [11]. Ранее, нами продемонстрировано, что штаммы *Mycolicibacterium smegmatis* с делециями генов *rel_{msm}* и *relZ* имели дефекты в биопленкообразовании [10]. Исходя из этого, сделано предположение, что антибиотик DMNP потенциально может быть эффективен против биопленочных сообществ, включая покоящиеся формы микобактерий.

В связи с этим, целью данной работы является исследование эффективности DMNP против биопленочных сообществ микобактерий в сравнении с противотуберкулезными антибиотиками первого ряда – рифампицином и стрептомицином.

В качестве объекта исследования использованы штаммы общепринятого модельного непатогенного организма, используемого при изучении микобактерий – *Mycolicibacterium smegmatis* mc² 155. Исходный родительский штамм служил в качестве контроля, а в качестве опытных использованы штаммы с делецией гена *rel_{msm}* или двойной делецией генов *rel_{msm}* и *relZ*.

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков определяли с помощью метода серийных разведений в иммунологических планшетах. Поверхностные биопленки микобактерий выращивали в предварительно взвешенных пластиковых чашках диаметром 40 мм. После инкубации фотометрически оценивали целостность поверхностной биопленки. За минимальную концентрацию, подавляющую биопленкообразование (МКПБ), принимали минимальную концентрацию антибиотика, при которой в чашке наблюдалось полное отсутствие поверхностной биопленки. После чего извлекали жидкую культуру с планктонными клетками, а чашку вместе с биопленкой высушивали до постоянной массы и гравиметрически определяли массу биопленки. Из чашек делали высевы жидкой культуры для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК). За МБК принимали минимальную концентрацию, при которой наблюдалось отсутствие роста колоний на агаре после инкубации.

Для корректного сравнения эффективности действия антибиотиков рифампицина и DMNP, необходимо было определить их минимальные подавляющие концентрации в отношении *M. smegmatis*. Установлено, что МПК антибиотика DMNP составила 95 мкг/мл, рифампицина – 4,8 мкг/мл, а рифампицина – 0,14 мкг/мл. Такая разница абсолютных значений концентраций объясняется тем, что метод определения МПК рассчитан на исследование антибиотиков, наиболее активных против активно растущих клеток, в то время как DMNP наиболее активен против клеток в стационарной фазе роста. Тем не менее, целью сравнения эффективности антибиотиков все последующие концентрации в исследовании указаны в значении кратностей МПК соответствующего антибиотика.

У микобактерий поверхностные биопленки, образующиеся на поверхности жидкой питательной среды, по своей биомассе во много раз превосходили придонные биопленки. При внесении сублетальных концентраций DMNP наблюдался эффект, фенотипически напоминающий дефектные биопленки штаммов с делециями: поверхностная биопленка фрагментировалась, а её части оставались на поверхности питательной среды. МКПБ для контрольного штамма составила 2,4 МПК, а МБК – 4,7 МПК. Штаммы с делецией одного гена *rel_{msm}*, а также двойной делецией *rel_{msm}* и *relZ* демонстрировали повышенную чувствительность к DMNP, выражавшуюся в уменьшении МКПБ и МБК. При этом чувствительность мутантных штаммов к антибиотику росла прямо пропорционально числу делеций генов. Кроме того, увеличение сублетальных концентраций DMNP приводило к уменьшению биомассы поверхностных биопленок, а сила действия препарата на биомассу возрастала пропорционально числу делеций. Если у штамма с делецией гена *rel_{msm}* индуцировали сверхэкспрессионную плазмиду, содержащую ген *rel_{msm}* или *relZ*, происходило полное восстановление показателей сухой биомассы, а также МКПБ. Если же плазида с теми же генами индуцировалась у штамма с двойной делецией генов *rel_{msm}* и *relZ*, то происходило лишь частичное восстановление показателей сухой биомассы. При этом динамика изменения показателей биомассы у плазмид с разными генами была одинакова, что свидетельствует о комплементарности этих генов. Бактерицидный эффект DMNP в отношении штаммов с делециями генов, ответственных за синтез ферментов-мишеней антибиотика можно интерпретировать по-разному. Возможно, DMNP, наряду с изученными, подавляет также активность пока неизвестных алармон синтетаз в клетках микобактерий. Кроме того, DMNP может, подобно другим антибиотикам, вызывать окислительный стресс, ведущий к накоплению в клетках активных форм кислорода, повреждающих ДНК, белки и липиды и вызывающих смерть клетки [12].

Рифампицин и стрептомицин обладают высокой эффективностью в отношении растущих клеток и отнесены к антибиотикам первого ряда при лечении туберкулеза, поэтому они были выбраны для сравнения с DMNP. В результате исследования влияния рифампицина на биопленкообразование было установлено, что МКПБ данного антибиотика для контрольного штамма составила 4,7 МПК, а минимальная бактерицидная концентрация равнялась 23 МПК. Штаммы с единичной и двойной делецией генов *rel_{msm}* и *relZ* были более чувствительны к рифампицину, но их значения МКПБ и МБК не отличались между собой.

Более того, МБК рифампицина для штаммов с делециями не отличалась от контрольного штамма *M. smegmatis*. По показателям МБК контрольного штамма новый антибиотик превосходил рифампицин почти в 5 раз, а по показателям МКПБ в 2 раза. Данные результаты свидетельствуют о том, что DMNP обладает более выраженным действием в отношении биопленочных сообществ по сравнению с рифампицином. Показатели МКПБ и МБК стрептомицина для контрольного штамма были 0,8 МПК и 1,6 МПК соответственно. Штамм с делецией гена *rel_{msm}* не отличался по чувствительности от контрольного. Штамм с двойной делецией генов был более устойчив к рифампицину: показатель МКПБ составил 1,2 МПК, а МБК – 2,4 МПК. Данный эффект стрептомицина можно объяснить тем, что мишенью антибиотика является 30S рибосомальная субъединица. Поскольку алармон синтетазы участвуют в регуляции числа рибосом в клетках, в отсутствие их продукта – (p)ppGpp – могло возрасти количество рибосом и снизиться эффективность антибиотика.

Таким образом, антибиотик DMNP, мишенью которого являются микобактериальные стринджен-факторы, нарушает процессы формирования биопленок, что делает его более эффективным по сравнению с рифампицином в отношении биопленочных сообществ. Антибиотик DMNP уступает стрептомицину по показателям МБК и МКПБ потому что мишенью его воздействия в первую очередь являются покоящиеся формы микобактерий, что делает его перспективным средством борьбы с латентными или хроническими формами туберкулеза.

Список цитируемой литературы

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. Т. – 76. – № 2. № С. 149–163
2. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? // Практ. медицина. – 2011. – Т. 5. – № 53. – С. 7–10
3. Niño-Padilla E.I., Velazquez C., Garibay-Escobar A. Mycobacterial biofilms as players in human infections: a review // Biofouling. – 2021. – V. 37 – № 4. – P. 410–432
4. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease // Expert. Rev. Anti Infect. Ther. – 2017. – V. 16. – № 1. – P. 51–65.
5. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Молекулярные механизмы персистенции бактерий // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2020. – V. 97. – № 3. – P. 271–279.
6. Ceri H., Olson M.E., Stremick C. et al. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms // J. Clin. Microbiol. – 1999. – V. 37. – № 6. – P. 1771–1776
7. WHO. Global tuberculosis report 2019. Geneva, 2019
8. Mandal S., Njikan S., Kumar A., Early J.V., Parish T. The relevance of persisters in tuberculosis drug discovery // Microbiology. – 2019. – № 165. – P. 492–499.
9. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y. et al. «A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases» // Cell Chem. Biol. – 2021. – № 28. – P. 1–13.
10. Rodríguez A.D., Ramírez C. Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* // J. Nat. Prod. – 2001. – V. 64. – № 1. – P. 100–102.
11. Incerti-Pradillos C.A., Kabeshov M.A., O'Hora P.S. et al. Asymmetric Total Synthesis of (-)-Erogorgiaene and Its C-11 Epimer and Investigation of Their Antimycobacterial Activity // Chemistry. – 2016. – V. 22. – № 40. – P. 14390–14396.
12. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // Cell. 2007. – V. 130. – № 5. – P. 797 – 810.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ (SO_3^{2-} , H_2S) В РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ

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

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Ключевые слова: антибиотики, неорганические метаболиты серы

Известно, что грамположительные бактерии рода *Bacillus* используют в качестве основного низкомолекулярного тиола бацитиол (BSH) [1, 2], который является функциональным аналогом более изученного глутатиона (GSH), широко распространенного как у грамотрицательных прокариот, так и у эукариот. В состав глутатиона и бацитиола входит серосодержащая аминокислота цистеин, определяющая высокую редокс-активность этих тиолов. В определенных ситуациях цистеин, взаимодействуя с Fe^{2+} в реакции Фентона, может образовывать высокотоксичные гидроксильные радикалы, поэтому живые клетки строго поддерживают гомеостаз внутриклеточного цистеина [3]. У эукариот и бактерий катаболизм цистеина может являться одним из источников H_2S [4]. Одним из промежуточных продуктов в метаболизме цистеина является сульфит (SO_3^{2-}). Ранее было обнаружено, что у грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, растущих на глюкозо-минеральной среде, стрессовые воздействия сопровождаются резким увеличением экстраклеточного H_2S и некоторым снижением SO_3^{2-} . Список стрессов включает голодание и обработку различными антибиотиками [5].

Цель настоящей работы: проверить динамику SO_3^{2-} и H_2S при обработке растущих клеток *B. subtilis* антибиотиками эритромицином и тетрациклином. Материалы и методы. Хранимые на твердой питательной среде клетки переносились в жидкую минеральную среду М9 + глюкоза (1%) и культивировались в орбитальном шейкере при 37°C и 110 об/мин. Через 20 часов культура центрифугировалась и ресуспендировалась в свежей среде аналогичного состава при исходной $\text{OD}_{600} = 0.1$. По достижении $\text{OD}_{600} = 0.4$ вносился исследуемый антибиотик в концентрациях 30, 60 и 120 мкг/мл. В течение часа после добавления антибиотика измерялась продукция H_2S и SO_3^{2-} . Данные анализировались при помощи пакета программ Excel 2010. 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. Концентрацию сульфита определяли методикой, описанной в источнике [7].

На рисунке 1 показана продукция сероводорода при обработке бактерий разными концентрациями тетрациклина в динамике (А) и суммарное выделение H_2S за 60 минут роста в присутствии антибиотика (Б). Достоверное выделение сульфида водорода наблюдалось при экспозиции клеток со всеми исследуемыми концентрациями тетрациклина, но дозозависимого эффекта не регистрировало. В этих же условиях, при обработке клеток *B. subtilis* 30, 60 и 120 мкг/мл тетрациклина выделение сероводорода повышалось в среднем на 40, 60 и 30%, соответственно, по сравнению с контролем. После добавления эритромицина была обнаружена корреляция между концентрацией антибиотика и временем максимальной продукции сульфида водорода. Бактерии *B. subtilis* выделяли максимальное количество H_2S на 15, 30 и 60 минуте эксперимента при добавлении 120 мкг/мл, 30 мкг/мл и 60 мкг/мл эритромицина, соответственно (рис. 2, 3).

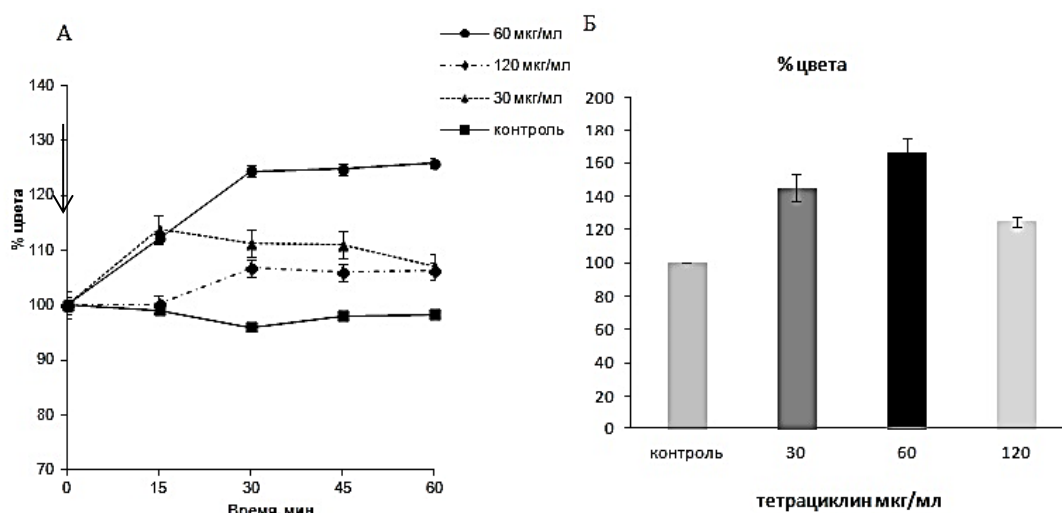


Рисунок 1 – Продукция сероводорода в растущих культурах *B. subtilis* при добавлении тетрациклина. А – изменение продукции H_2S в течение 60 минут. Б – суммарная продукция H_2S за 60 минут. Стрелкой указано добавление антибиотика

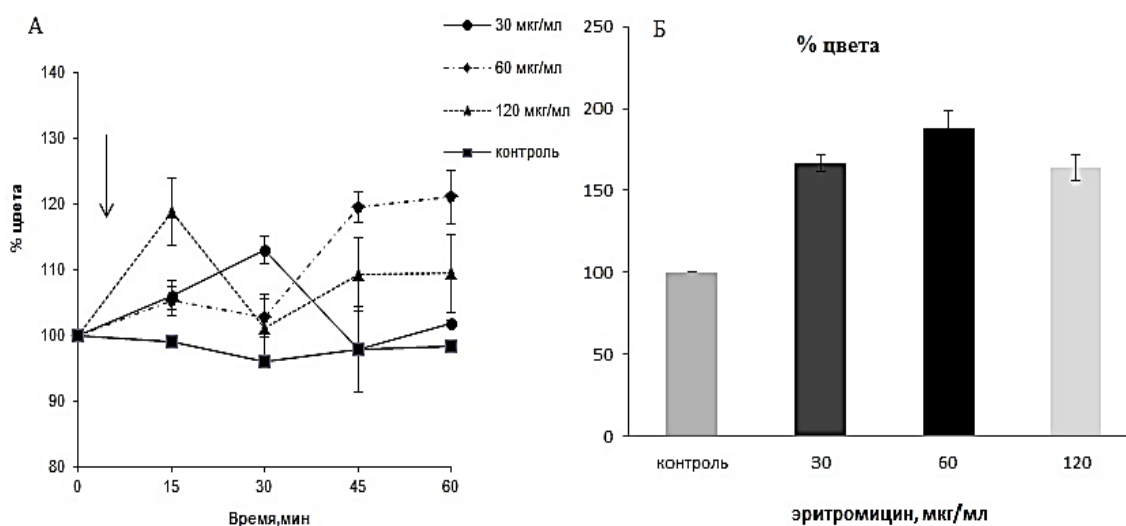


Рисунок 2 – Продукция сероводорода в растущих культурах *B. subtilis* при добавлении эритромицина. А – изменение продукции H_2S в течение 60 минут. Б – суммарная продукция H_2S за 60 минут

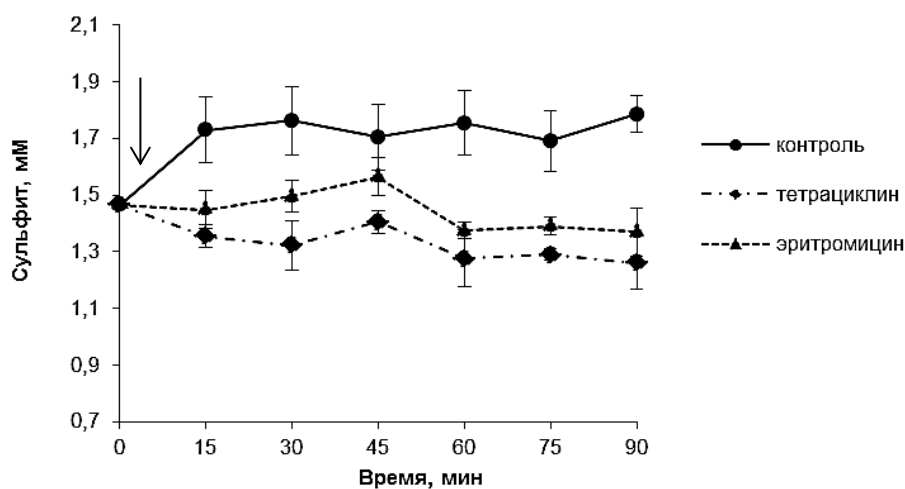


Рисунок 3 – Динамика экзоточного SO_3^{2-} при обработке клеток *B. subtilis* тетрациклином (60 мкг/мл) и эритромицином (60 мкг/мл).

Первый продукт восстановления сульфатов в клетке, который предшествует образованию сероводорода – это сульфит (SO_3^{2-}). Было проведено измерение его концентрации в среде культивирования бактерий *B. subtilis* при нормальном росте и при добавлении исследуемых антибиотиков. За 90 минут культивирования уровень сульфита в контроле повышался на 20% от исходного уровня, в то время как обработка клеток эритромицином и тетрациклином приводила к достоверному снижению концентрации сульфита на 35% по отношению к контролю. Наблюдаемое нами в этой работе выделение сероводорода после воздействия антибиотиков на растущие *B. subtilis* может быть связано с поддержанием гомеостаза цистеина у этих бактерий, как это наблюдалось ранее у *E. coli* [5].

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке гранта РФФИ №19-04-00888.

Список цитируемой литературы

1. Newton G.L., Rawat M., Clair J., Jothivasan V., Budiarto T., Hamilton C., Claiborne A., Helmann J., Fahey R. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli // Nat. Chem. Biol. – 2009. – V. 5(9). – P.625-627.
2. Gaballa A., Newton G.L., Antelmann H., Parsonage D., Upton H., Rawat M., Claiborne A., Fahey R.C., Helmann J.D. Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107(14). – P. 6482-6486.
3. Park S., Imlay J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185(6). – P. 1942–1950.
4. Mustafa A.K., Gadalla M.M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S.K., Barrow R.K., Yang G., Wang R., Snyder S.H. H₂S signals through protein S-sulfhydration. // Sci. Signal. – 2009. – V.2 (96): ra 72.
5. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells // Amino Acids. – 2019. – V.51 (10-12). – P. 1577-1592.
6. Bastiat B., Sauviac L., Picheraux C., Rossignol M., Bruand C. *Sinorhizobium meliloti* Sigma Factors RpoE1 and RpoE4 Are Activated in Stationary Phase in Response to Sulfite // PLOS ONE. – 2012. – V.7 (11). – P. 1 – 15.

ПОЛУЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Шардина К.Ю.¹, Щербакова Л.С.², Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.¹, Заморина С.А.^{1,2}
Черешнев В.А.^{1,2}

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

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: иммуносупрессия, MDSC, клеточная культура, дифференцировка

Миелоидные супрессорные клетки (myeloid – derived suppressor cells, MDSC) – гетерогенная популяция клеток миелоидного происхождения, представленная незрелыми нейтрофилами, дендритными клетками и моноцитами. Основной отличительной особенностью рассматриваемой клеточной популяции является способность подавлять иммунный ответ в организме, используя различные механизмы [1].

© Шардина К.Ю., Щербакова Л.С., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Заморина С.А.,
Черешнев В.А., 2021

Известно, что уровень MDSC увеличивается при многих патологических состояниях, включая воспаление, сепсис, травматический шок, аутоиммунные заболевания, ожирение [2]. Однако интересным является тот факт, что увеличение концентрации MDSC в периферической крови происходит также во время беременности. Именно поэтому важно иметь возможность изучения этих клеток, прежде всего на модели клеток человека. У человека MDSC характеризуются экспрессией маркеров HLA-DR⁺CD33⁺CD11b⁺, при этом внутри популяции MDSC существует подразделение на две субпопуляции: гранулоцитарную (G-MDSC) и моноцитарную (M-MDSC) [3]. Целью данного исследования являлась разработка экспериментальной модели, позволяющей оценивать дифференцировку MDSC человека из миелоидных клеток (CD33⁺).

В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) условно здоровых доноров (n = 6). МПК были получены центрифугированием в градиенте плотности (1,077 г/см³, DiaColl, «Диаэм», Россия). Монокультуры CD33⁺-клеток выделяли методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS® («Miltenyi Biotec», Германия) из суспензии МПК. Для генерации MDSC *in vitro* монокультуры CD33⁺-клеток культивировали в 96-луночном планшете в концентрации 1x10⁶ клеток/мл в полной питательной среде (RPMI-1640, 10 % FBS, 10 mM Hepes, 2 mM L-глутамина («ICN Ph.», США) и пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (100 мкл на 10 мл среды, «BI», Израиль)) в течение 7 суток (37⁰C, 5%CO₂). Для индукции миелоидных клеток CD33⁺ в фенотип MDSC применялись рекомбинантные цитокины ИЛ-6 (10 нг/мл) и ГМ-КСФ (10 нг/мл) («Milteniy Biotech», Германия). Замена среды в культуре производилась на 4 сутки. По окончании инкубирования оценивали жизнеспособность клеток с помощью красителя Zombie Aqua (ZA) («Biolegend», США). Процент живых (ZA-) клеток в культурах колебался в пределах 85,5-92,1%, достоверных различий между культурами выявлено не было. После стандартных процедур отмывок, клетки окрашивали антителами для цитофлуориметрического определения процента MDSC (HLA-DR^{-/low}CD33⁺CD11b⁺), M-MDSC (HLA-DR^{-/low}CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD66b⁺) и PMN-MDSC (HLA-DR^{-/low}CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD66b⁺). Окрашивание производили антителами к «R&D Systems». Определение процента субпопуляций клеток (MDSC, M-MDSC, G-MDSC) проводили на цитометре CytoFLEX S («Beckman Coulter», США). Файлы данных проточной цитометрии были проанализированы с помощью программы «KALUZA Analysis Software». Статистическую обработку данных осуществляли в GraphPad Prism 8, с использованием непараметрического критерия Уилкоксона.

Показано, что самостоятельный эффект индукции клеток цитокинами заключался в достоверном повышении уровня MDSC (с 1,54±0,97 до 8,88±2,63; n=6), при этом, клетки сохраняли высокую жизнеспособность. Таким образом, использования фракции миелоидных клеток (CD33⁺) позволяет получить MDSC в достаточном количестве в течение недели культивирования. Известно, что поверхностный маркер CD33 – молекула адгезии, которая относится к надсемейству иммуноглобулинов. Он экспрессируется на клетках миелоидного ряда и отсутствует на эритроцитах, тромбоцитах, В-клетках, Т-клетках или NK-клетках [4]. Таким образом, CD33 является отличным миелоидным маркером, что позволяет использовать эти клетки для получения MDSC с фенотипом HLA-DR^{-/low}CD33⁺CD11b⁺. Таким образом, мы разработали рабочую модель культивирования MDSC, которая позволит изучать роль различных веществ в регуляции дифференцировки и активности этих важных регуляторных клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-415-590001

Список цитируемой литературы

1. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid- derived suppressor cells as regulators of the immune system // Nat. Rev.Immunol. – 2009. – Vol. 9.- P. 162-174.

- Goedegebuure P., Mitchem J.B., Porembka M.R., Tan M.C.B., Belt B.A., Wang-Gillam A. Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer // Curr.Cancer Drug Targets .- 2011.- Vol. 11.- № 6. – P. 734-751.
- Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours // Nat.Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12. – №. 4. – P. 253-268.
- Naeim F., Rao P.N., Song S.X., Phan R.T. Chapter 2 – Principles of Immunophenotyping // Atlas of Hematopathology (Second Edition). – 2018. – P. 29-56.

ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА РЕДКИХ ВИДОВ РОДА *STIPA* L. НА ТЕРРИТОРИИ ТРОИЦКОГО ЛЕСОСТЕПНОГО ЗАКАЗНИКА

Шемякина К.С., Бельтюкова Н.Н.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Ключевые слова: ценопопуляция, Троицкий заказник, редкие виды, род *Stipa* L.

Генофонд планеты необратимо разрушается под прямым или косвенным воздействием антропогенных факторов. Сохранение биоразнообразия позволяет обеспечить устойчивость экосистем и биосферы в целом. Проблема сохранения видового разнообразия растений имеет огромное значение, и никогда еще не была столь актуальна, как в наши дни. Большое внимание при этом стоит уделять каждому отдельно взятому виду, сохранение которого возможно лишь при условии охраны его среды обитания со всем комплексом входящих в нее видов, климатических, геофизических и других условий. В первую очередь в охране нуждаются редкие декоративные дикорастущие виды, подвергающиеся наибольшей угрозе уничтожения.

В южной части лесостепного Зауралья (Троицкий район Челябинской области) находится участок целинной березовой лесостепи, который до сих пор в научной литературе именуется Троицким лесостепным заповедником. На его территории охраняются хорошо сохранившиеся участки ковыльно-разнотравных степей и березовых колков. Осенью 2017 г. исполнилось 90 лет со времени образования Троицкого лесостепного заповедника. Площадь Троицкого заказника – 1220 гектаров [1,2]. Исследования на территории Троицкого заказника проводились с 4. 06. 21 по 24. 06. 21. Целью исследований являлось изучение видового разнообразия представителей рода *Stipa* L. в заказнике Троицкий.

Были поставлены задачи по определению численности и плотности популяций рода *Stipa*, определение их возрастных спектров. Для подсчёта численности были отобраны 8 участков, на каждом из которых выбирались пробные площадки площадью 1м². Плотность особей представителей рода *Stipa* на пробной площадке представлена в таблице 1, а численность особей в ценопопуляциях – в таблице 2.

Таблица 1 – Плотность представителей рода *Stipa*

Пробная площадка	Плотность, шт/м ²	Проективное покрытие, %
Водопой	11	70
Шихан	0,0179	70
Стационар 1	17	85
Возле Шихана	9	85
3 м от оз. Пастушье	3	65
10 м от оз. Пастушье	9	70
Дендросад	0,00066	60
Солёный лог	11	40

Таблица 2 – Численность представителей рода *Stipa*

Пробная площадка	Площадь площадки, м ²	Численность представителей рода <i>Stipa</i>
Водопой	7118,5	78303
Шихан	1734,9	31
Стационар 1	95000	1615000
Возле Шихана	13446,6	121019
3 м от оз. Пастушье	1444	4332
10 м от оз. Пастушье	1254	11286
Дендросад	22750	15
Солёный лог	163625	1799875

Для определения возрастной структуры популяции для каждой особи описывалась стадия онтогенеза [3,4,5]. По классификации популяций по Ф. Боденхеймер (1938) популяции рода *Stipa* на территории Троицкого заказника можно отнести ко II типу – стационарные, с естественным соотношением особей с разных возрастных групп.

На территории заказника удалось обнаружить три вида представителей рода *Stipa*: *Stipa pennata* L. – Ковыль перистый, *S. tirsia* Stev. – К. узколистый (Тырса), *S. zaleskii* Wilenskiy – К. Залесского. *S. pennata* и *S. zaleskii* занесены в Красную книгу Челябинской области.

S. pennata имеет статус редкого вида (VU – уязвимый вид) III категория. В лесостепной зоне встречается с высоким обилием и является доминантом луговых степей, в степной зоне обычно выступает в роли ассектатора с небольшим обилием. Плотнoderновинный многолетник. Произрастает на южных склонах гор и холмов, в каменистой, настоящей и луговой степи, среди березовых колков [6,7]. Размножается семенами. На территории Троицкого заказника распространён возле Шихана.

S. zaleskii также имеет статус редкого вида (VU – уязвимый вид) III категория. Плотнокустовой травянистый многолетник. Произрастает в сухих ковыльных и типчаково-ковыльных степях, в которых нередко является эдификатором (особенно на юге степной зоны). Встречается также на остепненных каменистых склонах, обнажениях горных пород и солонцах. Размножается семенами [6,7]. На территории Троицкого заказника вид был обнаружен в Солёном логу на корковых солонцах. Для обнаруженных видов описывалась пространственная, возрастная структуры популяции. Возрастные спектры изученных видов рода *Stipa* L. полночленные, нормального типа.

Сбор гербарных образцов проводился в день описания каждой отдельно пробной площадки. Образцы пришивались к плотному листу бумаги. Для каждого образца была подготовлена этикетка с датой и метом сбора. Всего было подготовлено 10 гербарных образцов представителей рода *Stipa*, произрастающих на территории Троицкого заказника. Составлено геоботаническое описание пробных площадок. Совместно с представителями рода *Stipa* произрастают другие виды злаков. Часто встречаются поросли деревьев и кустарников.

Таким образом, исследования редких видов растений рода *Stipa* L. на территории Троицкого лесостепного заказника показало, что виды на данной территории представлены довольно большой численностью и имеют полночленные возрастные спектры нормального типа, что говорит о стабильном существовании этих популяций.

Список цитируемой литературы

1. Кадастровое дело № 020. Троицкий государственный природный комплексный заказник. Министерство экологии Челябинской области. 12 с.
2. Макарова Т.Н., Гизатуллин А.Н. 90 лет со времени образования троцкого лесостепного заповедника // Биосферное хозяйство: теория и практика. Троицк: ФГБОУВО Южно-Уральский ГАУ, 2018. 10 с.
3. Злобин Ю.А. Популяции редких видов растений: теоретические основы и методика изучения: монография. Сумы: Университетская книга, 2013. 439 с.

4. Злобин, Ю.А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений: учебно-методическое пособие. Казань: Изд-во Казанского университета, 1989. С. 86-109.
5. Oleso J. R. The cost of reproduction in plants // New Phytologist, 2002. Vbl. 155, no. 3. P. 321-348.
6. Губанов И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России: в 3 т. М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2002-2004.
7. Красная книга Челябинской области: животные, растения, грибы. 2-е изд. М.: Реарт, 2017. 504 с.

ПОГЛОЩЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ CD4⁺ Т-ЛИМФОЦИТАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, ПРИНИМАЮЩИХ ВЫСОКОАКТИВНУЮ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ

Власова В.В.¹, Сайдакова Е.В.^{1,2}, Королевская Л.Б.¹, Шмагель Н.Г.³, Шмагель К.В.¹

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

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

³Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД
и инфекционными заболеваниями, Пермь, Россия

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, Т-лимфоциты, клеточный метаболизм, активация

Введение. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) поражает CD4⁺ Т-лимфоциты, провоцируя их гибель и нарушения в работе иммунной системы [1]. При этом репликация ВИЧ происходит преимущественно в активированных клетках [6], поскольку процесс обратной транскрипции в покоящихся CD4⁺ Т-лимфоцитах протекает достаточно медленно [5]. В соответствии с этим, уровень активации CD4⁺ Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов прямо связан с вирусной нагрузкой в плазме крови и позволяет прогнозировать вероятность прогрессии заболевания в стадию СПИД [2]. Вопрос о том, какие свойства активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов позволяют им поддерживать репликацию ВИЧ, остается открытым.

Известно, что для поддержания процесса обратной транскрипции в клетке-мишени должно присутствовать достаточное количество дезоксинуклеозидтрифосфатов [4]. Как правило, для воспроизведения собственной генетической информации активированные CD4⁺ Т-клетки индуцируют синтез дезоксинуклеозидов *de novo* [7]. Данный процесс требует стабильного притока углерода и азота, основными источниками которых в клетке являются глюкоза, глутамин и жирные кислоты. Цель настоящей работы: определить насколько активно CD4⁺ Т-лимфоциты, изолированные из крови ВИЧ-инфицированных людей, потребляют метаболитические субстраты, которые могут быть использованы при репликации ВИЧ.

Материалы и методы исследования. План работы был утвержден этическим комитетом Пермского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (рег. № IRB00008964). Обследованы две группы: ВИЧ-инфицированные пациенты, получающие высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ; n=26), и относительно здоровые добровольцы (n=22). Каждый участник исследования подписал информированное согласие.

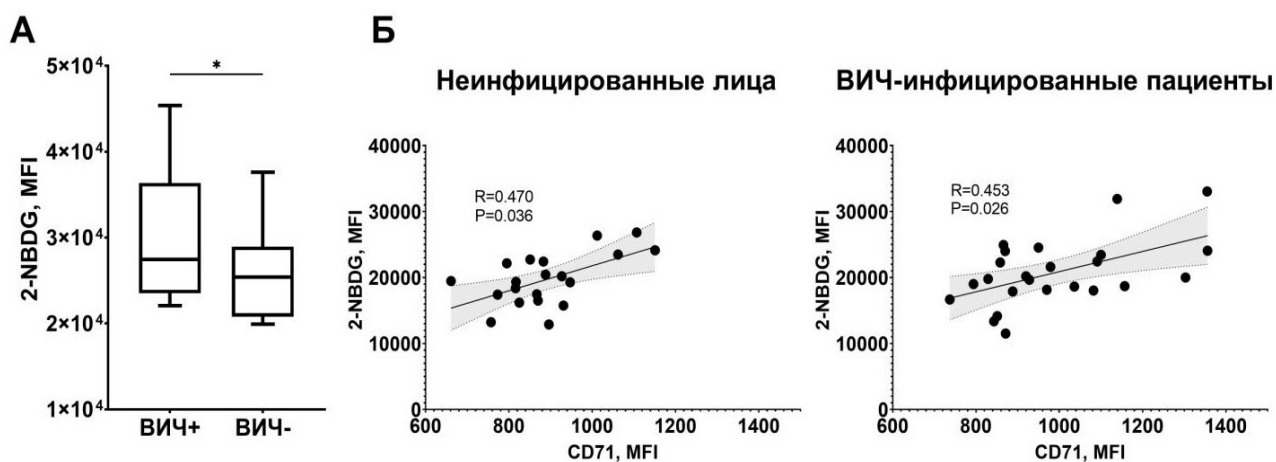
Кровь забирали из локтевой вены в пробирки типа «Vacutainer», содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту. Мононуклеарные клетки выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл, Диаэм, Россия) стандартным методом.

В течение суток образцы подвергали контролируемому замораживанию до -80°C в среде, содержащей 90 % инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Biowest, Франция) и 10 % диметилсульфоксида (AppliChem, Германия); затем помещали в жидкий азот для длительного хранения. Перед проведением исследования клетки размораживали при $+37^{\circ}\text{C}$ и последовательно отмывали в 10 мл полной питательной среды (RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), содержащая 10 % ЭТС, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fischer Scientific, США)) и в 10 мл раствора фосфатно-солевого буфера Дульбекко (DPBS; Gibco, США).

Анализ мононуклеарных лейкоцитов периферической крови проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию Zombie UV Fixable Viability Dye (Biolegend, США). Субпопуляцию CD4^{+} Т-лимфоцитов идентифицировали по связыванию с анти- CD3-PE-Dazzle594 и анти- CD4-PE-Fire780 антителами (Biolegend, США). При определении активированных CD4^{+} Т-клеток использовали анти- $\text{CD71-AlexaFluor700}$ (Invitrogen, США) антитела. Методом проточной цитометрии измеряли потребление CD4^{+} Т-лимфоцитами глюкозы и жирных кислот с применением флуоресцентных аналогов, соответственно, 2-NBDG (Abcam, Великобритания) и BODIPY FL C16 (Invitrogen, США). Клетки инкубировали в течение 15 мин в среде, содержащей 80 мкМ 2-NBDG или 50 нМ BODIPY FL C16. Уровень экспрессии транспортера глутамин оценивали по связыванию анти-ASCT2 и анти-IgG-AlexaFluor405 антител (Abcam, Великобритания) CD4^{+} Т-клетками.

Статистические расчеты и построение графиков осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов (25–75 перцентиль). Значимость различий между группами устанавливали с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Доля активированных CD4^{+} Т-лимфоцитов была выше у ВИЧ-инфицированных пациентов по сравнению со здоровыми людьми: 6,5 % (5,7–7,4 %) и 5,3 % (4,6–6,0 %). Различия между группами были статистически значимыми ($P < 0,05$). Глюкоза активно потреблялась большинством CD4^{+} Т-клеток, полученных от субъектов обеих групп: неинфицированные лица – 79,7 % (61,3–84,1 %); ВИЧ-инфицированные пациенты – 74,6 % (46,9–87,7 %). При этом количество поглощенной CD4^{+} Т-лимфоцитами глюкозы было повышено у ВИЧ-позитивных больных в сравнении с контрольной группой ($P < 0,05$; рис. А).



Потребление глюкозы CD4^{+} Т-лимфоцитами

А – интенсивность свечения флуоресцентного аналога глюкозы (2-NBDG) в CD4^{+} Т-клетках ВИЧ-позитивных (ВИЧ+) и здоровых (ВИЧ-) лиц. Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные размахи (прямоугольники) и 10–90 % размахи (вертикальные линии); * – $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни). Б – взаимосвязь между уровнем потребления глюкозы (ось ординат) и уровнем активации (ось абсцисс) в CD4^{+} Т-клетках. MFI: Mean Fluorescence Intensity (англ.) – средняя яркость флуоресценции

Между уровнем активации CD4⁺ Т-клеток и интенсивностью потребления ими глюкозы была установлена прямая корреляционная зависимость в каждой из исследуемых групп (рис. Б). Доля CD4⁺ Т-клеток, потребляющих пальмитиновую кислоту, не зависела от ВИЧ-статуса и была относительно невысокой: неинфицированные лица – 7,1 % (3,5–7,9 %); ВИЧ-инфицированные субъекты – 8,9 % (4,9–12,8 %). Среднее количество пальмитиновой кислоты, поглощаемой CD4⁺ Т-лимфоцитами ВИЧ-инфицированных больных, было сопоставимо с таковых здоровых людей ($P>0,05$). У всех обследованных лиц CD4⁺ Т-клетки экспрессировали на поверхности транспортер глутамин ASCT2. Оценка среднего уровня экспрессии данного белка у ВИЧ-позитивных и здоровых субъектов не выявила статистически значимых отличий между группами ($P>0,05$). Проведенный корреляционный анализ показал отсутствие связи между интенсивностью потребления жирных кислот или содержанием ASCT2 на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов с одной стороны, и уровнем активации данных клеток – с другой ($P>0,05$).

Таким образом, у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих ВААРТ, отмечается повышенный уровень активации в популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов. При этом усиление активации в CD4⁺ Т-клетках прямо связано с интенсивностью поглощения глюкозы. С захватом жирных кислот и экспрессией на поверхности транспортера глутамин активированное состояние CD4⁺ Т-клеток ассоциировано не было. Известно, что глюкоза является важным биосинтетическим субстратом: ее окисление сопровождается формированием промежуточных продуктов, участвующих в *de novo* синтезе нуклеотидов, белков и липидов [3]. Поскольку углерод, поступающий с глюкозой, необходим для протекания многих биосинтетических процессов, можно предположить, что ее активное потребление является одним из условий перmissивности CD4⁺ Т-лимфоцитов по отношению к ВИЧ.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии, созданной в рамках национального проекта «Наука и университеты», и является частью научной темы «Роль метаболизма CD4⁺ Т-клеток памяти в нарушении регенерации иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне антиретровирусной терапии».

Список цитируемой литературы

1. Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. // Lancet (London, England). 1996. № 9019 (348). С. 31–5.
2. Deeks S. G. [и др.]. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. // Blood. 2004. № 4 (104). С. 942–7.
3. Heiden M. G. Vander, Cantley L. C., Thompson C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation // Science. 2009. № 5930 (324). С. 1029–1033.
4. Meyerhans A. [и др.]. Restriction and enhancement of human immunodeficiency virus type 1 replication by modulation of intracellular deoxynucleoside triphosphate pools. // Journal of virology. 1994. № 1 (68). С. 535–40.
5. Plesa G. [и др.]. Addition of deoxynucleosides enhances human immunodeficiency virus type 1 integration and 2LTR formation in resting CD4⁺ T cells. // Journal of virology. 2007. № 24 (81). С. 13938–42.
6. Stevenson M. [и др.]. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. // The EMBO journal. 1990. № 5 (9). С. 1551–60.
7. Taylor H. E. [и др.]. Phospholipase D1 Couples CD4⁺ T Cell Activation to c-Myc-Dependent Deoxyribonucleotide Pool Expansion and HIV-1 Replication. // PLoS pathogens. 2015. № 5 (11). С. e1004864.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Luchnikova N.A., Ivanova K.M., Tarasova E.V., Grishko V.V., Ivshina I.B.</i> ACTINOBACTERIAL TRANSFORMATION OF OLEANANE TRITERPENOIDS	5
<i>Алеев В.С., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.</i> НОВЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА SALINISPRAERACEAE ИЗ СОЛЯНОЙ ШАХТЫ ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ.....	7
<i>Ахова А.В., Ткаченко А.Г.</i> РОЛЬ КАДАВЕРИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО СИНТЕЗА ПРИ АДАПТАЦИИ <i>ESCHERICHIA COLI</i> К ПЕРОКСИДНОМУ ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ	10
<i>Баяндина Е.А., Глебов Г.Г., Куюкина М.С.</i> ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МЕДИ НА БИОПЛЕНКИ РОДОКОККОВ	12
<i>Белоногова А. Г.</i> ВЫХОД СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ ГЛАДИОЛУСА В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	15
<i>Бельтюкова Н.Н., Султангазина Г.Ж., Бейшова И.С., Ульянов В.А., Бейшов Р.С.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕДКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА	18
<i>Бородкина М.С.</i> ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЖИВОТНЫЙ МИР В РАЙОНЕ РАЗМЕЩЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРЕДПРИЯТИЯ АО «АКТЮБИНСКИЙ ЗАВОД ХРОМОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ» (АО «АЗХС»).....	21
<i>Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Тимганова В.П., Храмцов П.В., Шардина К.Ю., Кропанева М.Д., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А.</i> ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА	22
<i>Быкова Я.Е., Максимова Ю.Г.</i> ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК.....	24
<i>Габова А.О., Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.</i> REAL-TIME МОНИТОРИНГ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ КАК СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ РАННЕГО ОТВЕТА НА СТРЕССЫ	27
<i>Гапонова И. И., Щетко В. А., Романова Л. В.</i> ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ <i>LACTOBACILLUS</i> <i>HELVETICUS</i> БИМ В-461 Г	30
<i>Голдырев В.Н.</i> ПОЛЕЗНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИЗ ТЕХНОГЕННО-МИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ (ХЕМОГЕННО- БИОГЕННЫЕ СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ)	33
<i>Горобец М.Г., Абдуллина М.И., Бычкова А.В.</i> ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ КРОВИ НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ПОД ДЕЙСТВИЕМ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ С ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	36
<i>Елисеева А.Д., Яхина А.И., Литасова А.С., Емельянова Н.С., Максимов А.Ю.</i> ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ АКРИЛОВОГО ГИДРОГЕЛЯ ДЛЯ ВЛАГОУДЕРЖАНИЯ, СТИМУЛИРОВАНИЯ РОСТА РАСТЕНИЙ И НОРМАЛИЗАЦИИ ПОЧВЕННОЙ СРЕДЫ.....	38
<i>Еськова А.И., Пономарева А.Л., Рыжманова Я.В., Щербакова В.А.</i> НОВЫЙ ВИД СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА <i>DESULFOSPOROSINUS</i> , ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ, СПОСОБНЫЙ К ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ.	41
<i>Жуланов А.А.</i> НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОИНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА ПРИ ИЗУЧЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ	42

<i>Калашикова Т.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.</i> ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ КОРМОВЫХ ТРАВ И ИХ ФЕНОЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНК	44
<i>Каримова Н.В., Поспелова Ю.С., Кузнецова М.В.</i> ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ УРОПАТОГЕННЫХ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ В УСЛОВИЯХ ПОЛИКЛИНИКИ И СТАЦИОНАРА	47
<i>Кокишарова А.Н., Данилова М.А.</i> СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ ЗЕМЛЯНИКИ ЛЕСНОЙ В КУНГУРСКОМ РАЙОНЕ	49
<i>Коньшиев И.В., Ананченко Б.А., Бывалов А.А.</i> СИЛОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ, ОЦЕНЕННЫЕ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ	51
<i>Корниенко Т.В., Малышева В.А., Данилова М.А.</i> КЛОНАЛЬНАЯ И ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ В ООПТ «ЗАКАМСКИЙ БОР» Г. ПЕРМЬ	53
<i>Куприна А. С., Четина О. А.</i> НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСМОПРОТЕКТОРЫ У РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ВТОРИЧНОГО ЗАСОЛЕНИЯ СРЕДЫ	55
<i>Лапоногова В.А., Шибанова Н. Л.</i> КУЛЬТУРЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ ЦИТРУСОВЫХ	59
<i>Лобанов А.Н., Назаров А. В., Назарова Э. А.</i> ДЕСТРУКЦИЯ ЛИНДАНА МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПЕСТИЦИДОМ ПОЧВ	62
<i>Лопаева Н. Л.</i> ВЛИЯНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА НА ЭКОСИСТЕМУ ПЛАНЕТЫ	64
<i>Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Щетко В.А.</i> МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА	66
<i>Малышева А.А., Ястребова О.В., Плотникова Е.Г.</i> ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ <i>PAENARTHROBACTER</i> SP. SA101.	69
<i>Минкевич И.Г.</i> КОМПЬЮТЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ	71
<i>Михайловская В.С., Артамонова О.А., Кузнецова М.В.</i> МОНИТОРИНГ ШИГА-ТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> В ПОПУЛЯЦИИ ЗДОРОВЫХ ЖИВОТНЫХ	72
<i>Москвина Н.В., Фаткуллина А.З.</i> ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ УРБОСТРАТОЗЕМОВ ЖИЛЫХ РАЙОНОВ Г. ПЕРМИ МЕТОДОМ ФИТОТЕСТИРОВАНИЯ	74
<i>Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г.</i> ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ АКРИЛАМИДА И ЕГО ВЛИЯНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ	76
<i>Мухина М.В., Михеев П.Б., Якубова К.С., Бакланов М.А.</i> АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ ИКРЫ И ЛИЧИНОК РЕЧНОГО ОКУНЯ <i>PERCA FLUVIATILIS</i> В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ	79
<i>Наумов В.А. Наумова О.Б., Брюхов В.Н., Голдырев В.В., Мозитова К.И.</i> ПРИРОДОПОДОБНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ОСВОЕНИЯ ТЕХНОГЕННО-МИНЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ	82
<i>Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.</i> СОДЕРЖАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПОЛИАМИНОВ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ЗАВИСЯЩИЕ ОТ ИНДОЛА	85

<i>Орлова М.С., Паньков Н.Н.</i> СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ПИТАНИЯ ХАРИУСА <i>THYMALLUS THYMALLUS</i> В ВЕРХНЕМ ТЕЧЕНИИ Р. ВИШЕРЫ (СЕВЕРНЫЙ УРАЛ)	88
<i>Паньков Н.Н.</i> ЖИВОТНОЕ НАСЕЛЕНИЕ ПЕЩЕР ПЕРМСКОГО КРАЯ	90
<i>Пахоруков И.В.</i> ХИМИЗМ ЗАСОЛЕНИЯ АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ В ЗОНАХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СОЛЕВЫХ ОТХОДОВ.....	93
<i>Переломов Л.В., Сизова О.И., Атрощенко Ю.М., Переломова И.В.</i> МИКРООРГАНИЗМЫ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ КАНАЛИЗАЦИИ, УСТОЙЧИВЫЕ К ЗАГРЯЗНЕНИЮ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ.....	95
<i>Пескова Е.В., Землянова М.А., Булатова Н.И., Кольдибекова Ю.В.</i> ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕГАТИВНЫХ ЭФФЕКТОВ СО СТОРОНЫ СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТОЙ И НЕРВНОЙ СИСТЕМ У ДЕТЕЙ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ МЕДИ И НИКЕЛЯ В КРОВИ.....	98
<i>Пирожкова И.С., Пермязова И.А.</i> УТИЛИЗАЦИЯ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ КУЛЬТУРОЙ ДРОЖЖЕЙ <i>YARROWIA</i> <i>LIPOLYTICA</i>	101
<i>Писцова О. Н., Куюкина М. С., Ившина И. Б.</i> ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ ПЕРЕМЕННОЙ ВАЛЕНТНОСТИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РОДОКОККОВ	103
<i>Питкин Д. Н., Лямин М. Я.</i> СТРУКТУРА И ДИНАМИКА СООБЩЕСТВ АНТОФИЛЬНЫХ НАСЕКОМЫХ НЕКОТОРЫХ ЗОНТИЧНЫХ (АРИАСЕАЕ) ТРОИЦКОГО ЗАКАЗНИКА	105
<i>Поленогова О. В., Ярославцева О. Н., Кривопапов А.В., Носков Ю. А., Клементьева Т. Н., Ходырев В. П., Крюкова Н. А., Крюков В. Ю., Глухов В. В.</i> ЗНАЧЕНИЕ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ КОЛОРАДСКОГО ЖУКА В УСТОЙЧИВОСТИ К БИОИНСЕКТИЦИДАМ	107
<i>Полыгалов М.А., Тюмина Е.А., Ившина И.Б.</i> БИОДЕГРАДАЦИЯ КЕТОПРОФЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РОДОКОККОВ	108
<i>Пономарева А.Л., Еськова А.И., Полоник Н.С., Шакиров Р.Б., Обжиров А.И.</i> ОСОБЕННОСТИ БИОДЕСТРУКЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ СЕВЕРНОЙ ЧАСТИ ЯПОНСКОГО МОРЯ	110
<i>Порубов В.С., Заморина С.А.</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛЬЦЕВЫХ МОЛЕКУЛ ДНК Т- И В-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ТРЕС И КРЕС, КАК МЕТОД ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ	113
<i>Поспелова А.Д.</i> БИОТОПИЧЕСКАЯ ПРИУРОЧЕННОСТЬ И ЖИЗНЕННЫЕ ФОРМЫ МУРАВЬЁВ КУНГУРСКОЙ ЛЕСОСТЕПИ	115
<i>Поспелова Ю.С., Ремезовская Н.Б., Кузнецова М.В.</i> ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ СРЕДЫ НА КОНЬЮГАТИВНЫЙ ПЕРЕНОС ПРОИЗВОДНОЙ F-ПЛАЗМИДЫ В КЛЕТКИ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	118
<i>Проничева К.А.</i> ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И ПРОМЫШЛЕННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИ СТРОИТЕЛЬСТВЕ ТРУБОПРОВОДОВ	119
<i>Пьянкова А.А., Малышева А.А., Ястребова О.В.</i> РАЗНООБРАЗИЕ <i>benA</i> -ГЕНОВ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕМЕЙСТВА <i>MICROCOCCACEAE</i>	122
<i>Рогозин М. В. Михалев В. В.</i> ЭНЕРГИИ ЗЕМЛИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РАСТИТЕЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА	124

Роцкая У.Н., Крюков В.Ю., Косман Е.С., Тюрин М.В. Глухов В.В. ИДЕНТИФИКАЦИЯ РИЦИНОВОГО-В-ЛЕКТИНА LdRBLk У КОЛОРАДСКОГО ЖУКА И АНАЛИЗ ЕГО ЭКСПРЕССИИ В ОТВЕТ НА ГРИБНУЮ ИНФЕКЦИЮ.....	127
Сидоров Р.Ю., Ткаченко А.Г. АНАЛИЗ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ АЛАРМОН СИНТЕТАЗЫ МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНГИБИТОРА ПЕРСИСТЕНЦИИ	129
Субботина М.В., Бажутин Г.А., Ившина И.Б. ОСОБЕННОСТИ БИОДЕСТРУКЦИИ ИБУПРОФЕНА КЛЕТКАМИ <i>RHODOCOCCLUS CERASTII</i> ИЭГМ 1243	132
Сутормина Л.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОВ	134
Сыровацкая Г.А., Максимова Ю.Г. ТРАНСФОРМАЦИЯ АКРИЛОНИТРИЛА АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ СОДОВОГО ШЛАМОХРАНИЛИЩА	137
Сюткина Д.А., Четина О.А. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА У РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ	140
Татаринев Н. Д., Переведенцева Л. Г. НОВЫЕ И РЕДКИЕ ВИДЫ ГРИБОВ ООПТ «АНДРОНОВСКИЙ ЛЕС».....	143
Тимганова В.П., Бочкова М.С., Ужвиюк С.В., Шардина К.Ю., Заморина С.А. ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ ЧЕЛОВЕКА	146
Тройнич Я.Н., Чарушина Ю.А., Логинова Н.П., Заморина С.А. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЛИКОДЕЛИНА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ <i>IN VIVO</i>	148
Тюленев А.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н., Габова А.О. ПОЛУЧЕНИЕ ОБОГАЩЕННЫХ ЭКСТРАКТЕТОЧНЫМИ ТИОЛАМИ КУЛЬТУР <i>ESCHERICHIA COLI</i>	151
Тян С.М., Тюмина Е.А. БИОДЕСТРУКЦИЯ ФАРМПОЛЛЮТАНТА НАПРОКСЕНА	153
Устинова А.Л., Тиунов А. В. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О СУТОЧНОЙ АКТИВНОСТИ ПАУКОВ-КРУГОПРЯДОВ (ARANEI: ARANEIDAE) <i>CYCLOSA CONICA</i> (PALLAS, 1772) И <i>MANGORA ACALYPHA</i> (WALCKEANAER, 1802).....	154
Фофанова Ю.С., Кайгородов Р. В. ВЛИЯНИЕ КДО НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ РЖИ И ЛЮПИНА	157
Ханжина Н. Е., Новоселова Л. В. АВТОМАТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЁРЕН ДЛЯ АЭРОПАЛИНОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА С ПОМОЩЬЮ ГЛУБОКИХ ГЕНЕРАТИВНЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ.....	159
Хаова Е.А., Кашеварова Н.М., Ткаченко А.Г. ВЛИЯНИЕ ИНДОЛА НА ЭКСПРЕССИЮ ФАКТОРОВ СТРЕССОРНОГО ОТВЕТА <i>ESCHERICHIA COLI</i>	159
Храмцов П.В., Кропанева М.Д. НАНОЧАСТИЦЫ БЕРЛИНСКОЙ ЛАЗУРИ: СИНТЕЗ, КОНТРОЛЬ РАЗМЕРОВ И ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ МЕТОК В ИММУНОАНАЛИЗЕ	167
Цыганов И.В., Сидоров Р.Ю., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ЭРОГОРГИАЕНА ПРОТИВ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОВ В СРАВНЕНИИ С ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ПЕРВОГО РЯДА	168

Чурин Г.Ю., Ушаков В.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ (SO ₃ ²⁻ , H ₂ S) В РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ	171
Шардина К.Ю., Щербакова Л.С., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Заморина С.А. Черешнев В.А. ПОЛУЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	173
Шемякина К.С., Бельтюкова Н.Н. ПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА РЕДКИХ ВИДОВ РОДА <i>STIPA</i> L. НА ТЕРРИТОРИИ ТРОИЦКОГО ЛЕСОСТЕПНОГО ЗАКАЗНИКА	175
Власова В.В., Сайдакова Е.В., Королевская Л.Б., Шмагель Н.Г., Шмагель К.В. ПОГЛОЩЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ CD4 ⁺ Т-ЛИМФОЦИТАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ, ПРИНИМАЮЩИХ ВЫСОКОАКТИВНУЮ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ	177

Научное издание

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ
БИОИНФОРМАТИКИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И НЕДРОПОЛЬЗОВАНИЯ**

*Сборник статей всероссийской научной конференции
с международным участием
(18–20 октября 2021 года, г. Пермь)*

Издается в авторской редакции
Техническая подготовка материалов: *М. Я. Лямин*

Объем данных 7 Мб
Подписано к использованию 17.11.2021

Размещено в открытом доступе
на сайте www.psu.ru
в разделе НАУКА / Электронные публикации
и в электронной мультимедийной библиотеке ELiS

Издательский центр
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15