

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

Научно-практический журнал

Основан в 2005 году

Главный редактор

Р.Г. Василов

Редакционная коллегия

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

Редакционный совет

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),
К.Г. Скрябин (Москва), Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Воробьева

Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru, ptashka095@rambler.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр
медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

СОДЕРЖАНИЕ

Колонка главного редактора

К читателям. *Р.Г. Васильев* 4

Оригинальные статьи

Оценка генотоксической активности некоторых растений, содержащих фитотоксины.
М.В. Иванова 5

Тестирование полифенолов для таргетной терапии тирозинкиназного рецептора MET в клеточной культуре аденокарциномы тонкой кишки.
Г.М. Артыкбаева, Э.С. Хашимова, И.Р. Ялалова, А.А. Мамадрахимов..... 10

Низкотемпературное хранение различных штаммов цианобактерий *Arthrospira platensis*.
Д.И. Петрухина, И.Н. Лыков 16

Математическая модель процесса лиофилизации в технологии вакцины чумной живой.
А.А. Лещенко, С.А. Швецов, В.В. Крупин, С.В. Багин, А.В. Ежов, А.Г. Лазыкин, С.В. Логвинов, Д.А. Мохов, В.В. Бирюков, А.Р. Зиганшин 21

Углеводная специфичность поверхностных лектинов грибов *Fusarium solani*.
Риш.С. Мухаммадиев, Рин.С. Мухаммадиев, Т.В. Багаева 26

Средоулучшающие биотехнологии: *Ceratophyllum demersum* как фактор снижения концентраций тяжелых металлов в воде.
В.А. Поклонов 31

Оценка продуктивности *Medusomyces gisevii* с помощью величин рН и электропроводимости.
В.В. Рогожин, Ю.В. Рогожин 38

Некоторые фенотипические особенности галофильных микроорганизмов из природных биотопов Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан).
Э.А. Халилова, Д.А. Аливердиева, С.Ц. Котенко 44

Обзоры

Влияние нефти как неблагоприятного фактора на растения и фиторемедиация нефтезагрязненных территорий.
А.Ю. Степанова, А.И. Соловьева, Е.А. Гладков 51

Проблема охраны растительных сообществ.
Т.М. Лысенко 58

Методы и технологии культивирования туляремийного микроба.
О.А. Волох, А.В. Комиссаров, Д.Н. Бибииков, К.И. Холматов, Н.Г. Авдеева, А.К. Никифоров 65

Геоинформационные технологии как инструмент информационного анализа в рамках обеспечения мониторинга инфекционных заболеваний, в том числе особо опасных инфекций на территории России.
В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко, И.В. Архангельская, С.В. Титова, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, М.И. Ежова, А.Р. Квасов 71

Правила для авторов 78

CONTENTS

Column of the editor-in-chief

To readers. *R.G. Vasilov* 4

Original articles

Evaluation of genotoxic activity of some plants containing phytotoxins.
M.V. Ivanova 5

Testing of polyphenols for target therapy of tyrosine kinase receptor MET in the cell culture of small intestine adenocarcinoma.
G.M. Artykbaeva, Z.S. Khashimova, I.R. Yalalova, A.A. Mamadrahimov 10

Low-temperature storage of various strains of cyanobacteria *Arthrospira platensis*.
D.I. Petrukhina, I.N. Lykov 16

Mathematical model of the lyophilization process in a live plague vaccine technology.
A.A. Leshchenko, S.A. Shvetsov, V.V. Krupin, S.V. Bagin, A.V. Ezhov, A.G. Lazykin, S.V. Logvinov, D.A. Mokhov, V.V. Biryukov, A.R. Ziganshin 21

Biochemical characteristics of surface lectins of *Fusarium solani*.
Rish.S. Mukhammadiyev, Rin.S. Mukhammadiyev, T.V. Bagayeva 26

Improved biotechnology: *Ceratophyllum demersum* as a factor in reducing concentrations of heavy metals in water.
V.A. Poklonov 31

Evaluation of the productivity of *Medusomyces gisevii* with the values of pH and electrical conductivity.
V.V. Rogozhin, Yu.V. Rogozhin 38

Some phenotypic features of halophilic microorganisms from natural habitats of the Terek-Kuma Lowland (Republic of Dagestan).
E.A. Khalilova, D.A. Aliverdiyeva, S.C. Kotenko 44

Reviews

Influence of oil as an unfavorable factor on plants and phytoremediation of oil contaminated territories.
A.Yu. Stepanova, A.I. Solov'eva, E.A. Gladkov 51

The problem of protecting plant communities.
T.M. Lysenko 58

Methods and technologies of cultivation of *Tularemium* microbe.
O.A. Volokh, A.V. Komissarov, D.N. Bibikov, K.I. Holmatov, N.G. Avdeeva, A.K. Nikiforov 65

Geoinformation technologies as a tool of information analysis in the framework of monitoring of infectious diseases, including especially dangerous infections in the territory of Russia.
V.D. Kruglikov, D.A. Levchenko, I.V. Arkhangelskaya, S.V. Titova, E.V. Monakhova, A.S. Vodopyanov, M.I. Ezhova, A.R. Kvasov 71

Rules for authors 78

К читателям

В третьем номере журнала за 2017 год помещена подборка статей разнопланового характера. В работе М.В. Ивановой из Самарского национального исследовательского университета рассмотрен вопрос о цитотоксическом и мутагенном действии растений, содержащих фитотоксины.

Группа исследователей из Ташкентского Института биоорганической химии им. А.С. Садыкова (Актыкбаева Г.М. и др.) оценила возможности полифенолов для таргетной терапии аденокарциномы тонкой кишки в культуре.

Коллективом авторов из Кирова (Лещенко А.А. и др.) разработана математическая модель процесса лиофилизации в технологии вакцины чумной живой.

Мухаммадиев Риш.С. и др. (Казанский федеральный университет) публикуют свои новые данные об углеводной специфичности поверхностных лектинов грибов *Fusarium solani*.

Поклонов В.А. (Международный независимый эколого-политологический университет, Москва) приводит результаты обстоятельного исследования потенциала средоулучшающих биотехнологий с целью снижения концентраций тяжелых металлов в воде.

Петрухина Д.И. и Лыков И.Н. (Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского) обобщили результаты исследований по эффективности криосохранения аксенного штамма *Arthrospira platensis* РСС 9108 и неаксенных штаммы *Arthrospira platensis* SAG 21.99 и SAG 257.80 при температуре -80°C в присутствии глюкозы.

Рогожин В.В., Рогожин Ю.В. (Якутская государственная сельскохозяйственная академия) осуществили оценку продуктивности *Medusomyces gisevii* с помощью величин рН и электропроводимости.

Халилова Э.А. и др. (Прикаспийский институт биологических ресурсов, ДНЦ РАН, Махачкала) исследовали фенотипические особенности галофильных микроорганизмов из природных биотопов Терско-Кумской низменности (Республика Дагестан).

В номере помещены обзорные работы:

- «Влияние нефти как неблагоприятного фактора на растения и фиторемедиация нефтезагрязненных территорий» (Степанова А.Ю. и др., Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва) — в исследовании рассмотрено влияние нефти как неблагоприятного экологического фактора на различные виды растений. Перечислены растения, обладающие фиторемедиационными свойствами;
- «Проблема охраны растительных сообществ» (Лысенко Т.М., Институт экологии Волжского бассейна, Тольятти) — в обзоре представлены современные данные о проблеме охраны растительных сообществ в России и за рубежом, а также о принципах и критериях выделения редких и нуждающихся в охране растительных сообществ;
- Волох О.А. с соавт. (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова) подготовили обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам культивирования туляремийного микроба;
- Кругликов В.Д. с коллегами из Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора и Ростовского государственного медицинского университета Минздрава России проанализировали возможности пополняемой базы данных геоинформационной системы «Холера 1989–2014», которая позволяет комплексно охарактеризовать фено- и генотипические свойства штаммов *V. cholerae* O1, O139 различной эпидзначимости.

Главный редактор,
президент Общества биотехнологов России,
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ФИТОТОКСИНЫ

М.В. ИВАНОВА*

ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет
имени академика С.П. Королева», Самара

В статье приводятся данные по скринингу цитотоксического и мутагенного действия с помощью Allium-теста сока четырех видов высших растений, обладающих дерматотоксическим действием. Экспериментально выявлено токсическое и цитотоксическое воздействие цельного и разбавленного сока токсичных растений по отношению к тест-объекту, а также мутагенное воздействие.

Ключевые слова: Allium-тест, *Allium сера*, ана-телофазный анализ, хромосомные aberrации, мутации, *Aconitum napellus*, *Dictamnus gymnostylis*, *Rhus toxicodendron*, *Ruta graveolence*, митотический индекс, генотоксичность, токсичность.

Введение

Огромное разнообразие вторичных соединений, входящих в состав фитомассы высших растений, обладает высокой биологической активностью, а также токсичностью. Эти соединения, выступая в качестве хемозффекторов (хемомодуляторов), защищают растения от фитопатогенов, фитофагов, участвуют в формировании аллелопатической среды, влияют на развитие сапрофитной микрофлоры и обеспечивают господство растений на нашей планете. Несмотря на преимущественно инсектицидный характер действия фитотоксинов, они представляют опасность для человека. Растительные экстракты широко применяются в виде фитотерапевтических препаратов, биологически активных добавок, пищевых продуктов, их использование является частью человеческой культуры (Macia, 2007 [6]; Martinez-Frances, 2015 [7]; Журба, Дмитриев, 2008 [3]). По оценкам Всемирной организации здравоохранения, до 80% населения мира опирается на традиционную систему лекарств для какого-либо аспекта первичной медико-санитарной помощи (Akinboro, Vakare, 2007 [5]; Prajitha, Thorpil, 2016 [8]). Многие ядовитые растения используются в качестве декоративных, при несоблюдении простых мер предосторожности возникает опасность для здоровья челове-

ка. Мы сочли своевременным и значимым осуществить оценку возможного цитотоксического и мутагенного эффекта для фитомассы высших растений, содержащих высоко активные хемозффекторы и способных вызывать у человека отравления и поражения кожи. Для растений, выбранных в качестве объектов, подобный скрининг, насколько нам известно, ранее не проводился. В то же время эти растения доступны для контакта с ними, в частности, в Ботаническом саду Самарского университета.

Целью нашего исследования было выявление с помощью Allium-теста возможных генотоксических эффектов сока некоторых растений, содержащих фитотоксины. Для исследования были выбраны аконит клубочковый *Aconitum napellus* L., ясенец голостолбиковый *Dictamnus gymnostylis* Stev., токсикодендрон укореняющийся *Rhus toxicodendron* (L.) Kuntze, рута душистая *Ruta graveolence* L.

Материалы и методы

Образцы собранных листьев в августе 2015 года в Ботаническом саду Самарского университета (аконит клубочковый выращен на садовом участке в районе пос. Старо-Семейкино) замораживали и хранили при -16 °С. После разморозки их использовали для проведения тестирования, отжимая сок и сразу же вводя в тест-среду. Тестирование выполняли на чашках Петри, семена лука репчатого сорта Штутгартен Ризен размещали на бумажных фильтрах, смоченных дистиллированной водой (контроль), либо цельным или разбавленным (0,5; 1; 5; 10; 50%) соком исследуемого растения (опыт). Чашки Петри помещали в термостат, инкубировали 5 суток.

© 2017 г. Иванова М.В.

* **Автор для переписки:**

Иванова Мария Витальевна,

биолог, магистрант биологического факультета Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королева», ГБУЗ СО «Самарская МСЧ 2»

E-mail: mariaivon@gmail.com

Дальнейшие процедуры проводили, придерживаясь стандартного протокола Allium-теста. Особенности цитотоксического действия оценивали по изменениям величины митотического индекса (МИ), относительной длины каждой фазы митоза. В анализе исследовали не менее 1000 клеток с каждой повторности контроля и опыта. Для оценки генотоксического действия использовали ана-телофазный анализ хромосом в клетках меристемы корешков лука. Для опыта, а также контроля анализировали не менее 280 ана-телофаз с каждой повторности. Таким образом, было проанализировано не менее 30000 клеток. Статистическая обработка данных и построение диаграмм проводилось с использованием пакета Excel. Для сравнения общих результатов скрининга действия различных концентраций сока пар протестированных растений был использован вариант двухфакторного дисперсионного анализа (Плохинский, 1980) [4].

Результаты и обсуждение

Начальные результаты выполненного нами тестирования связаны с возможностью биологически активных веществ растений влиять на всхожесть семян. Мы обнаружили, что всхожесть семян продемонстрировала тенденцию к снижению с увеличением концентрации сока всех исследуемых растений (рис. 1). Возможно, помимо собственно токсического действия, неразбавленный сок может выступать в качестве гипертонического раствора, который не служит источником воды для нужд проростка.

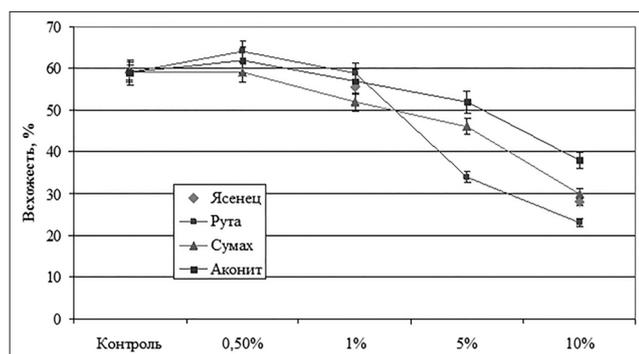


Рис. 1. Влияние сока исследуемых растений на всхожесть семян лука репчатого

Тенденция к повышению всхожести семян, по сравнению с контрольным значением, наблюдалась при использовании 0,5%-ной концентрации сока руты и аконита. Близкие к контролю значения замечены для 0,5%-ной концентрации сока сумаха и 1%-ной концентрации руты. Небольшое снижение показателя всхожести видно

в случае 1%-ного сока ясенца, а также 1%- и 5%-ного сока аконита и сумаха. Все остальные случаи демонстрируют снижение уровня роста семян, особенно 10%-ный сок руты, что говорит о его повышенной токсической способности в данном опыте, по сравнению с другими растениями. Следует отметить, что при использовании 50%- и 100%-ной концентрации соков исследуемых растений не наблюдалось роста семян *A. sera*. Однако в опыте с применением 50%-ной концентрации сока руты проросло 1 семя. Данный образец был окрашен, но ядра увидеть не удалось, что говорит о росте благодаря растяжению клеток. Поэтому данный объект был исключен из опыта.

Оценка цитотоксичности разбавленных до различной концентрации соков исследуемых токсичных растений показала следующее (рис. 2, 3): максимальное значение митотического индекса в данном опыте, превышающее контрольное значение почти в 1,5 раза, зафиксировано при воздействии на семена соком ясенца 1%-ной концентрации, что говорит о чувствительности некоторых фаз митоза к воздействию биологически активных веществ в соке этого растения — увеличилось количество профаз.

Высокие значения митотического индекса видны в случаях использования 0,5%-ного сока аконита (увеличилось число метафаз и телофаз), 1%-ного сока руты (увеличение профаз и метафаз в большей степени), 0,5%-ного (возросло значение метафаз и анафаз) и 5%-ного сока сумаха (больше метафаз и телофаз).

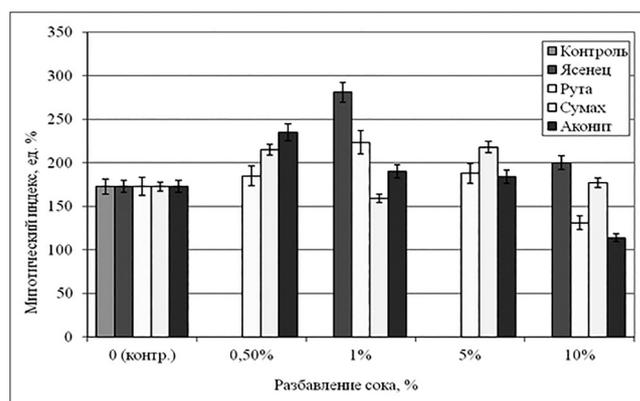


Рис. 2. Изменения показателя митотического индекса в меристеме корней проростков семян лука под влиянием сока тестируемых растений

Сок руты в 0,5%- и 5%-ной концентрации, аконита в 1%- и 5%-ной, а также 10-кратно разбавленные соки ясенца и сумаха продемонстрировали небольшое увеличение митотического индекса, близкое к значению контроля. Это оказалось следствием увеличения доли

метафаз, телофаз и анафаз (в меньшей степени). Снижение митотического индекса наблюдалось при воздействии 1%-го сока сумаха (профаз в 2 раза меньше, чем в контроле), соков руты (меньше анафаз и телофаз) и аконита (2-кратное уменьшение профаз) при их 10-кратном разбавлении. Это свидетельствует о тормозящем пролиферацию корней *A. sera* действии. Поскольку обнаруживаются изменения митотического индекса при воздействии различных разбавлений соков токсичных растений, на практике это может означать сохранение воздействия на объект, когда попавший на поверхность сок полностью не смывает.

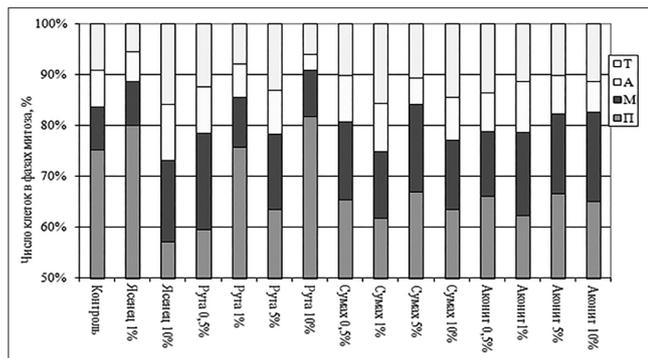


Рис. 3. Распределение клеток меристемы корней проростков семян лука по фазам митоза в норме и под влиянием сока тестируемых растений

Сравнивая общие результаты скрининга действия различных концентраций сока пар протестированных растений с использованием двухфакторного дисперсионного анализа, можно отметить, что течение трех процессов, а именно: зависимость среднего показателя митотического индекса от степени разбавления цельного сока токсичных растений, очень похожи (рис. 4). Критерии различия среднего уровня процессов (F_1) и критерии непараллельности процессов (F_2) недостоверны ($F_1 < 5,3$; $F_2 < 4,1$).

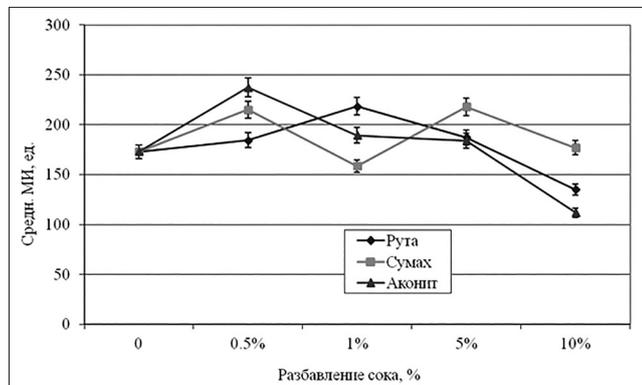


Рис. 4. Динамика среднего показателя митотического индекса биотеста под влиянием токсичных растений в зависимости от разбавления сока

Ана-телофазный анализ (рис. 5) показал низкую чувствительность в связи с высокой степенью хромосомных aberrаций в контроле, а также малым количеством анафаз и телофаз из-за блока на стадии профазы (или метафазы) в опытных образцах. Однако стоит отметить, что действие 10%-ной концентрации соков ясенца, аконита, а также 10%- и 1%-ного сока сумаха вызвало рост уровня хромосомных aberrаций, что может говорить об их генотоксическом эффекте.

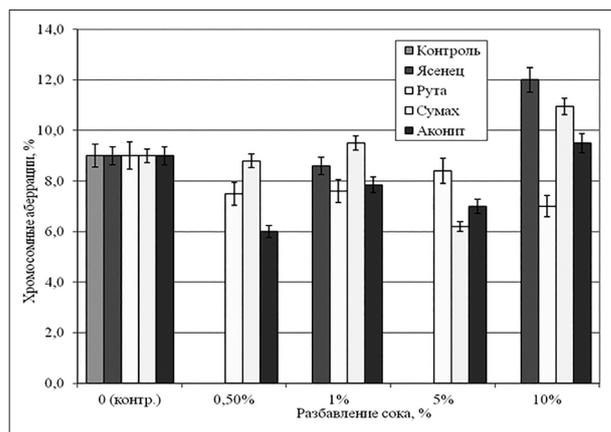


Рис. 5. Количество хромосомных aberrаций в корневой меристеме проростков семян лука в норме и под влиянием сока растений, %

Сопоставив с контролем выраженность хромосомных aberrаций в различных вариантах опыта, мы выявили некоторую зависимость (рис. 6).

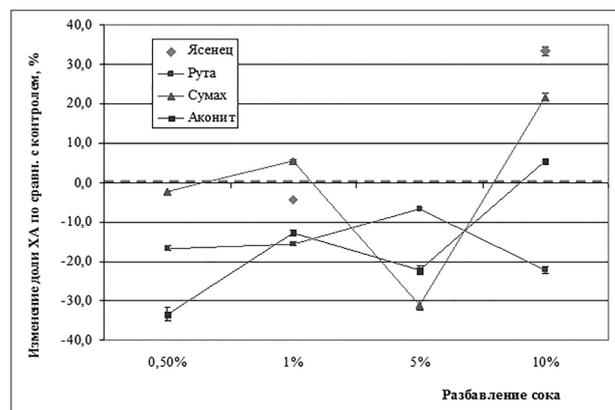


Рис. 6. Изменение выраженности хромосомных aberrаций в корневой меристеме проростков семян лука под действием разбавленных соков тестируемых растений

Этот прием более отчетливо проявил увеличение по сравнению с контролем доли хромосомных aberrаций при действии соков аконита, сумаха и особенно ясенца при 10%-ном разбавлении. Большая степень разбавления соков тестируемых растений соответствовала меньшей выраженности хромосомных aberrаций по сравнению с

уровнем контроля, что прослеживалось для сока аконита, а также для всех протестированных концентраций сока руты (см. рис. 6).

Были встречены следующие типы хромосомных aberrаций: фрагментация хромосом, отставания, мосты и микроядро. Также встречались смешанные типы (рис. 7).

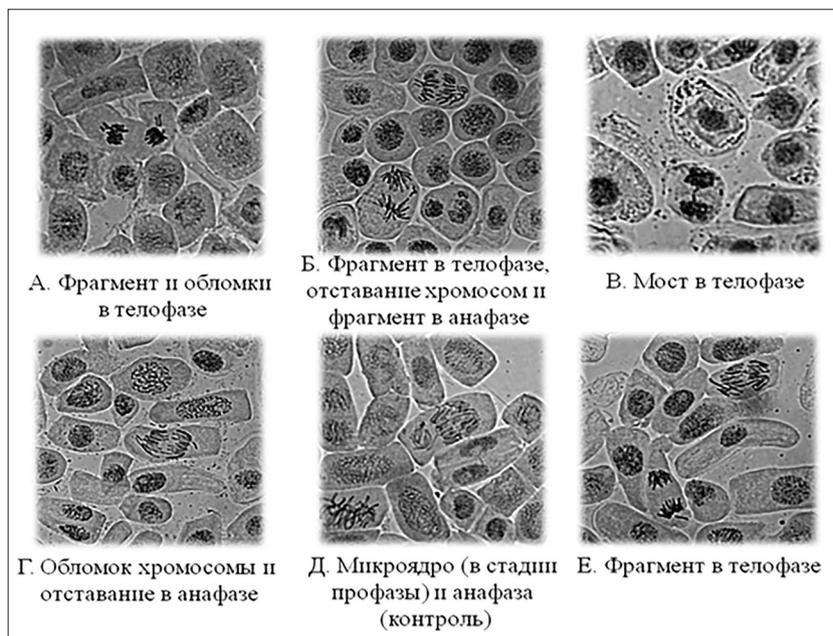


Рис. 7. Типы хромосомных aberrаций, встреченные в результате действия на семена *A. sera* концентрированного сока растений, содержащих фитотоксины (увеличение $\times 600$)

Фрагментация хромосом приводит к другим хромосомным aberrациям — нехваткам, инверсии, дупликации и транслокации. Отставание хромосом при расхождении к полюсам возникает при повреждении хромосомы в области кинетохора, поэтому такие хромосомы беспорядочно располагаются в цитоплазме и не попадают в дочерние ядра. Образование моста также вызывает разнородность дочерних ядер, углубляет патологию митоза, нарушая течение завершающих стадий деления, задерживает завершение цитотомии. Судьба возникших микроядер неодинакова: одни из них подвергаются разрушению и выводятся из клетки, другие, как и вся клетка, прodelывают полный клеточный цикл (Айала Ф., Кайгер Дж., 1988) [1].

Микроядра сохраняют способность вступать в митоз. Вероятно, что за счет митотического цикла микроядер в клетке сохраняется генетический материал поврежденной хромосомы и, возможно, частично восстанавливается активность некоторых ее компонентов (Алов И.А., 1972) [2].

Заключение

Выполненное нами исследование продемонстрировало, что сок растений, обладающих дерматотоксическим эффектом (сумах ползучий, ясенец голостолбиковый,

рута душистая) и токсичностью (аконит клобучковый), проявлял по отношению к биотесту цитотоксичный и мутагенный эффекты, изменяя всхожесть и рост корней проростков лука, затрагивая величину митотического индекса и индуцируя хромосомные aberrации. Таким образом, для всех протестированных растений были экспериментально выявлены токсическое и мутагенное действие.

Люди, контактирующие с данными растениями, подвержены риску, потому что попадание концентрированного сока таких растений на кожу может привести к различным патологиям. Нами установлено, что влияние оказывают и соки в различной степени разбавления. Это означает, что не смытый с кожи сок продолжает влиять на клетки, вызывая различные по степени тяжести поражения. Поэтому во избежание тяжелых последствий очень важно соблюдать меры предосторожности при работе с растениями, содержащими фитотоксины, а пораженные места кожи — незамедлительно обрабатывать специальными средствами. При уходе за такими растениями следует использовать индивидуальные средства защиты кожи. Особенно опасным в этом случае является использование триммеров для скашивания, что приводит к распылению на значительное расстояние мелких фрагментов фитомассы и капелек сока. При озеленении детских и

лечебных учреждений выращивание таких растений должно быть исключено, на личных садовых участках — по возможности ограничено.

Литература

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. Т. 3. — М.: Мир, 1988. — 332 с.
2. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. — М.: Медицина, 1972. — 264 с.
3. Журба О.В., Дмитриев М.Я. Лекарственные, ядовитые и вредные растения. — М.: КолосС, 2008. — 512 с.
4. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии / Под ред. академика АН УССР Гнеденко Б.В. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1980. — 150 с.
5. Akinboro A., Bakare A.A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. // Journal of Ethnopharmacology. — 2007. — Vol. 112. — P. 470–475.
6. Macia F., Galindo J. Evolution and current status of ecological phytochemistry // Phytochemistry. — 2007. — Vol. 68. — P. 2917–2936.
7. Martinez-Frances V. et al. An ethnopharmacological and historical analysis of «Dictamnus», a European traditional herbal medicine // Journal of Ethnopharmacology. — 2015. — Vol. 175. — P. 390–406.
8. Prajitha V., Thoppil J.E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. Using *Allium cepa* assay // South African Journal of Botany. — 2016. — Vol. 102. — P. 18–25.

EVALUATION OF GENOTOXIC ACTIVITY OF SOME PLANTS CONTAINING PHYTOTOXINS

M.V. IVANOVA

Academician S.P. Korolev Samara National Research University, Samara

The article presents data on screening of cytotoxic and mutagenic effects with the help of the *Allium*-test juice of four species of higher plants possessing dermatotoxic effect. The toxic and cytotoxic effects of whole and diluted juice of toxic plants in relation to the test object and a mutagenic effect have been experimentally revealed.

Keywords: *Allium*-test, *Allium cepa*, ana-telophase analysis, chromosomal aberrations, mutations, *Aconitum napellus*, *Dictamnus gymnostylis*, *Rhus toxicodendron*, *Ruta graveolence*, mitotic index, genotoxicity, toxicity.

ТЕСТИРОВАНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ ТИРОЗИНКИНАЗНОГО РЕЦЕПТОРА MET В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОНКОЙ КИШКИ

Г.М. АРТЫКБАЕВА*, З.С. ХАШИМОВА, И.Р. ЯЛАЛОВА, А.А. МАМАДРАХИМОВ

Институт биоорганической химии им. А.С. Садыкова АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Рецептор мезенхимо-эпителиального перехода (mesenchymal epithelial transition – MET) – тирозинкиназный рецептор, который играет существенную роль в инициации и развитии малигнизации клеток. Определенные натуральные продукты проявляют потенциальный ингибирующий эффект на активацию MET. Целью данной работы было исследование цитотоксической активности препаратов растительного происхождения в клеточной культуре аденокарциномы тонкой кишки Акат, а также их эффекта на ингибирование тирозинкиназного рецептора MET. Аберрантное фосфорилирование рецептора является первым этапом, инициирующим туморогенный сигнал при канцерогенезе. Все препараты (кумарин, катехин, эпигаллокатехин-3-галлат, лютеолин, рутин) показали антипролиферативный эффект в подавлении клеток Акат методом МТТ. Катехины и лютеолин обнаружили достоверный тормозящий эффект на фосфорилирование MET. Наибольшим ингибирующим эффектом в блокировании сигнального пути MET обладал эпигаллокатехин-3-галлат.

Ключевые слова: рецептор MET, фосфорилирование, клеточная культура аденокарциномы тонкой кишки Акат, полифенолы.

Введение

В настоящее время возникает большой интерес к разработке новых терапевтических агентов, которые поражают сигнальные молекулы, участвующие в росте, выживании и прогрессировании малигнизированных клеток с высокой специфичностью. Преимущество такой таргетной терапии заключается в повышении эффективности и уменьшении побочных эффектов. В связи с этим привлекает внимание исследователей рецептор тирозинкиназы MET. Экспрессируясь в клетках эпителиального происхождения, MET активируется своим лигандом – фактором роста гепатоцитов (HGF), который продуцируется в мезенхимальных клетках. Сигналинг HGF-MET является критическим для эпителиально-мезенхимальных взаимодействий (ЭМВ), сопровождающих нормальные функции, включая миграцию, морфологию, деление клеток и восстановление при ремоделировании ткани. Но MET также участвует в прогрессировании малигнизации. Избыточная или нерегулируемая ак-

тивность MET раковых клеток связывается с плохим прогнозом, приводящим к агрессивному фенотипу, характеризующемуся повышенным ангиогенезом, инвазией и метастазами [15].

Повсеместность активации пути MET при раке и его малигнизированный фенотип, основанный на мутированном, амплифицированном и сверхэкспрессированном MET, дают основание полагать, что он является привлекательной терапевтической мишенью для многих опухолей.

Определенные натуральные продукты обнаруживают потенциальное тормозное влияние на активацию MET. Полифенолы – группа химических соединений с одним или блоком фенольных колец на молекулу – оказывают положительный эффект на здоровье, включая защиту от рака благодаря их антиоксидантной активности. Однако полифенолы могут связываться с сигнальными молекулами и регулировать их активность. Более того, связывание полифенолов и таргетных белков определяется их структурными взаимоотношениями, что предполагает, что разные полифенолы связываются с разными таргетными белками, приводя к расходящимся химиопреентивным эффектам [8].

В связи с этим ведутся интенсивные исследования внутриклеточных мишеней для фитопрепаратов в модели *in vitro*. В нашей работе мы исследовали эффект различных полифенолов в клеточной культуре адено-

© 2017 г. Артыкбаева Г.М., Хашимова З.С., Ялалова И.Р., Мамадрахимов А.А.

* Автор для переписки:

Артыкбаева Гульнора Мухамедовна

к.б.н., старший научный сотрудник Института биоорганической химии АН РУз, Ташкент

E-mail: gulnoraar@rambler.ru

карциномы тонкой кишки мыши Акат с целью анализа антипролиферативных и цитотоксических свойств. Далее было изучено влияние препаратов на активность тирозинкиназного рецептора MET. Аберрантное фосфорилирование рецептора является первым этапом, инициирующим туморогенный сигнал при канцерогенезе. Агенты, которые снижают тирозинкиназную активность, включают в себя низкомолекулярные вещества, которые блокируют связывание АТФ с каталитическим центром, таким образом ингибируя автофосфорилирование рецептора и рекрутирование молекул нижележащего сигнального каскада. Среди исследованных нами препаратов наибольшим ингибирующим эффектом на этот процесс обладал эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG).

Материалы и методы

Были изучены полифенолы различных групп: флавоны — лютеолина с молекулярной массой (Мм) 285, флавонолы — катехин с Мм 290, эпигаллокатехин-3-галлат с Мм 457, гликозид флавонола кверцетин — рутин с Мм 609, лактон кумарина с Мм 146. Лютеолин, рутин, кумарин были выделены из шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*), катехины — из косточек винограда.

Использованные фитопрепараты были выделены и затем идентифицированы методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Методом ESI-масс-спектрометрии (электроспрей) получали масс-спектры веществ, используя масс-спектрометр 6420 TripleQuadLC/MS (Agilent Technologies, USA). Регистрацию масс-спектров образцов проводили с отрицательной ионизацией. Параметры масс-спектрометра были выбраны следующие: диапазон сканирования 100–2200 м/z, расход газа осушителя — 3 л/мин, температура газа — 300 °С, давления газа на игле распылителя — 20 psi, температура испарителя — 300 °С, напряжение на капилляре — 4000 В.

Клеточная культура аденокарциномы тонкой кишки мыши Акат была выведена нами, запатентована и получено положительное решение (12.04.2017 № ПР20140285). Для опыта клетки рассеивали в 96-луночные платы в количестве 20–30 тыс./мл в 100 мкл среды RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки эмбриона теленка, L-глутамин, антимикотик-антибиотик (Himedia, Индия), и культивировали при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе [1]. Цитотоксический эффект веществ оценивали МТТ-тестом. Через сутки в клетки вводили вещества в концентрациях 10 и 20 мкМ, культивировали клетки в течение 24 часов и далее вводили в клетки

МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид] для выявления живых клеток. После часовой инкубации среду осторожно сливали, добавляли ДМСО и инкубировали 20 мин, затем измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 620 нм. Контролем служили клетки без веществ [1].

Для определения фосфорилирования рецептора MET клетки Акат рассеивали в 96-луночные планшеты с плотностью $1,5 \times 10^4$ в 100 мкл среды RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки эмбриона теленка, L-глутамин, антимикотик-антибиотик (Himedia, Индия) и культивировали при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе. Клетки обрабатывали тестируемыми веществами (в концентрации 10, 20 мкМ) и инкубировали в течение часа при 37 °С в присутствии 20 нг/мл HGF. Клетки лизировали и в образцах определяли уровень фосфорилирования рецептора по тирозину набором Phospho-MET ELISA Kit (Sigma, Aldrich) с помощью моноклональных антител к фосфорилированному рецептору MET. Уровень фосфорилирования определяли по оптической плотности при длине волны 450 нм на Multimode Reader En Spine (Perkin, Elmer).

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерных программ STATISTICA_12. Для определения достоверности малых выборок ($n < 12$) использовался непараметрический критерий рандомизации компонент Фишера для связанных выборок. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение цитотоксических свойств фитопрепаратов на клеточной культуре Акат

В связи с тем, что рак тонкой кишки не является часто встречающейся формой неоплазии, мало известно о цитотоксичности полифенолов в отношении клеточной культуры аденокарциномы тонкой кишки.

На первом этапе мы изучали антипролиферативный эффект препаратов с помощью МТТ-теста (табл. 1). Результаты продемонстрировали, что лютеолин обладал выраженным дозозависимым эффектом. Он проявлял максимальный ингибирующий эффект и в дозе 20 мкМ вызывал 55% редукции раковых клеток ($p < 0,001$). Наименьший ингибирующий эффект был обнаружен у рутина (10,22±1,0% и 12,69±1,65% при 10 мкМ и 20 мкМ, соответственно, $p < 0,01$). Цитотоксический эффект катехина и кумарина проявлял тенденцию к снижению по мере возрастания концентрации. Катехин показывал

умеренный антипролиферативный эффект. Активность катехина была $20,99 \pm 1,1\%$ и $14,95 \pm 2,1\%$ при 10 и 20 мкМ, соответственно ($p < 0,001$ и $p < 0,01$). Активность кумарина была $29,39 \pm 5,31\%$ и $20,34 \pm 4,09\%$ ($p < 0,01$). Цитотоксичность EGCG была $18,0 \pm 1,1$ и $25,0 \pm 1,4\%$ ($p < 0,001$).

Таким образом, все препараты с небольшим преимуществом лютеолина показали антипролиферативный эффект в подавлении клеток Акат методом МТТ.

Таблица 1

Цитотоксическая активность препаратов в клеточной культуре Акат

Образцы	МТТ-тест, % подавления	
	10 мкМ	20 мкМ
Кумарин	$29,39 \pm 5,31$ $p < 0,01$	$20,34 \pm 4,09$ $p < 0,01$
Катехин	$20,99 \pm 1,1$ $p < 0,001$	$14,95 \pm 2,1$ $p < 0,01$
EGCG	$18,0 \pm 1,1$ $p < 0,001$	$25,0 \pm 1,4$ $p < 0,001$
Лютеолин	$39,0 \pm 3,94$ $p < 0,001$	$55,0 \pm 1,89$ $p < 0,001$
Рутин	$10,22 \pm 1,0$ $p < 0,01$	$12,69 \pm 1,65$ $p < 0,01$

Примечание: p — достоверность различий относительно клеток без применения веществ

Изучение фосфорилирования рецептора MET при инкубации клеточной культуры Акат с фитопрепаратами

Активация MET широко распространена при колоректальном раке, при котором показано, что он является драйвером проинвазивных и метастатических процессов и коррелирует с плохим прогнозом. Недавние исследования показали, что карцинома стволовых клеток толстой кишки ассоциируется с сигнальным путем HGF [6]. Аберрантная активация MET, связанная с его амплификацией и сверхэкспрессией, найдена при раке желудка, причем последняя является наиболее широко распространенной [16]. Доказательства свидетельствуют, что нарушенная регуляция сигнального пути MET коррелирует с агрессивностью опухоли при панкреатической карциноме [3], его сверхэкспрессия найдена в карциномах желчных путей и желчного пузыря [16]. Таким образом, MET сверхэкспрессируется при желудочно-кишечных опухолях, в частности раке кишечника. В связи с этим представляет интерес поиск лигандов, ингибирующих активацию рецеп-

тора в этой ткани. В данной работе мы протестировали наши препараты на фосфорилирование рецептора MET в клеточной культуре аденокарциномы тонкой кишки с помощью моноклональных антител к фосфорилированному по тирозину рецептору MET.

Известно, что кумарины обладают разносторонней фармакологической активностью: проявляют спазмолитическое, фотосенсибилизирующее, противоопухолевое, антикоагулянтное и другие виды действия. Тесты на генотоксичность и мутагенез предполагают, что кумарин нетоксичен [7].

Кумарин не показал достоверного эффекта на функциональную активность рецептора MET. В концентрации 10 мкМ он тормозил фосфорилирование рецептора на 6%, а в концентрации 20 мкМ — на 13%. (табл. 2).

Таблица 2

Эффект фитопрепаратов на фосфорилирование рецептора MET в клеточной культуре Акат

Образцы	ELISA, % фосфорилирования	
	10 мкМ	20 мкМ
Кумарин	$94,08 \pm 1,66$	$87,24 \pm 0,36$
Катехин	$77,44 \pm 0,55$ $p < 0,05$	$80,77 \pm 3,51$ $p < 0,05$
EGCG	$83,43 \pm 2,62$ $p < 0,05$	$71,53 \pm 2,21$ $p < 0,05$
Лютеолин	$81,63 \pm 1,52$ $p < 0,05$	$81,27 \pm 0,49$ $p < 0,05$
Рутин	$93,3 \pm 0,72$	$89,1 \pm 2,01$

Примечание: p — достоверность различий относительно клеток без применения веществ

Следующим объектом исследования были флавонолы — катехины. В настоящее время широко изучается роль катехинов, выделенных из зеленого чая, как противораковых терапевтических агентов, ингибирующих сигнальный путь MET и потенциально блокирующих инвазивный рост рака. Работы по биодоступности катехинов демонстрируют, что уровень EGCG после потребления чая достигает низкого микромолярного ряда. Циркулирующие уровни EGCG достигают 10 мкМ после оральноего применения чистого EGCG [11].

В наших экспериментах катехин, выделенный из косточек винограда, в концентрации 10 мкМ снижает фосфорилирование рецептора на 22,6%, в концентрации 20 мкМ — на 19,2%, $p < 0,05$ (табл. 2).

Компонентом с наибольшим потенциалом противоопухолевой активности считается эпигаллокатехин-3-галлат. Он ингибирует много сигнальных путей. EGCG тормозит клеточную пролиферацию, индуцирует апоптоз и тормозит запуск клеточного цикла. Найдено, что EGCG наиболее эффективен в понижении фосфорилирования EGFR при раке молочной железы [4]. Интенсивное торможение роста было найдено в группах, получавших высокие дозы EGCG (>100 мкМ), в различных клеточных линиях рака головы и шеи [10]. В клетках карциномы ороговевающего эпителия мыши эпигаллокатехин достоверно ингибировал клеточную пролиферацию при дозах 80 мкМ, а EGCG эффективно подавлял пролиферацию при 100 мкМ. С помощью Western blot было показано, что EGCG в концентрации 0,15 мкМ полностью блокировал активацию MET. Многочисленные работы показали, что EGCG имеет множественные мишени, включая рецепторы тирозинкиназ, такие как EGFR и MET.

По нашим данным, EGCG вызывал наибольшее подавление фосфорилирования MET (в концентрации 10 мкМ на 16,6%, в концентрации 20 мкМ — на 28,5%, $p < 0,05$) (см. табл. 2).

Другой представитель полифенолов лютеолин — широко распространенный флавоноид, содержится в брокколи, луке, зерновых и имеет различные биологические эффекты, включая антираковую активность во многих типах клеточных линий. Ранее сообщалось, что лютеолин проявляет противоопухолевый эффект в моделях рака желудка, сверхэкспрессирующих MET, но каким путем лютеолин регулирует прогрессирование, оставалось неясным [14]. В наших экспериментах при добавлении лютеолина в концентрации 10 мкМ отмечалось снижение уровня фосфорилирования MET на 18,37% ($p < 0,05$), при концентрации 20 мкМ показатель оставался на том же уровне (см. табл. 2). Интересно, что протеомные исследования показали, что лютеолин ингибирует ЭМВ в клетках колоректального рака путем подавления экспрессии связывающего белка цАМФ-отзывчивого элемента [13]. Он менял направление ЭМВ, увеличивая экспрессию эпителиального биомаркера E-кадгерина и уменьшая мезенхимальные маркеры N-кадгерин и виментин [18].

Рутин, хорошо известный гликозид кверцетина, присутствующий в разных натуральных продуктах, обнаруживает различную биологическую активность, включая противовоспалительные, антиоксидантные и противоопухолевые свойства. Рутин проявлял способность к ингибированию пролиферации клеток человеческой гепатомы по дозозависимому механизму, а также инвазии

и образования колоний и увеличению апоптоза [9]. Было найдено, что фенольные экстракты рутин проявляли ингибирующий эффект на рост клеток рака молочной железы через подавление p38/MAP-киназного пути, индуцируя апоптоз и отрицательно регулируя прогрессию клеточного цикла от фазы G1 до S [12].

Цитотоксические исследования показали, что обработка клеток аденокарциномы толстой кишки HT-29 различными концентрациями рутин уменьшает клеточную пролиферацию по дозо- и время-зависимому механизму [17]. Рутин индуцировал апоптоз через рецепторные и митохондриальные пути апоптоза, поэтому он предлагался к использованию при разработке терапии рака толстой кишки [7]. В наших экспериментах при тестировании рутин наряду с его цитотоксическим эффектом мы не обнаружили достоверных изменений в степени ингибирования рецептора. Наблюдалось незначительное уменьшение уровня фосфорилирования MET на 6,71 и 10,9% при концентрации 10 и 20 мкМ соответственно (см. табл. 2).

Заключение

Мы протестировали цитотоксичность растительных препаратов на клеточной культуре аденокарциномы тонкой кишки мыши и показали, что полифенолы в разной степени тормозят пролиферацию клеток при физиологических и близких к физиологическим концентрациях. Таким образом, они представляют потенциал для использования этих компонентов как химиопреventивных и терапевтических агентов. Одним из механизмов действия препаратов может быть блокирование фосфорилирования тирозинкиназных рецепторов. С помощью иммуноферментного анализа мы протестировали количественно уровень фосфорилирования рецептора MET. Среди изученных препаратов катехины и лютеолин в дозе 10 и 20 мкМ проявили достоверный ингибирующий эффект на фосфорилирование MET. Наибольшим ингибирующим эффектом обладал EGCG в дозе 20 мкМ. Поскольку на клеточной мембране расположена панель тирозинкиназных и других рецепторов (более 60 видов), возможно, цитотоксический эффект рутин и кумарина связан с рекрутированием отличных от MET каналов.

Катехины зеленого чая интенсивно изучаются в последнее время. Ряд исследований обнаружил обратную корреляцию между концентрацией полифенолов в моче и частотой рака желудка, уменьшением частоты встречаемости рака толстой кишки у лиц, потребляющих зеленый чай. Улучшенный прогноз отмечался у пациенток

с диагнозом рак молочной железы I и II стадии, которые употребляли более 5 чашек чая. Как уже было сказано, одним из предполагаемых механизмов, с помощью которых EGCG опосредует эти эффекты, является ингибирование некоторых членов семейства тирозинкиназ и клеточных сигнальных путей [2]. В связи с этим важно разрабатывать химиопреентивные агенты, действующие на специфические молекулярные и клеточные мишени при различных типах рака. Среди апробированных препаратов EGCG, выделенный из косточек винограда, является наиболее эффективным в блокировании сигнального пути рецептора MET и может рассматриваться как кандидат для таргетной терапии рака тонкой кишки.

Литература

1. Кахарова К.А., Хашимова Э.С., Сагдиев Н.Ж. Лектино-подобные белки повилики: характеристика и биологическая активность // ЕСУ. — 2016. — № 3(24). — С. 40–43.
2. Bigelow R., Cardelli J. The green tea catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-Epicatechin-3-gallate (EGG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and tumorigenic breast epithelial cells // *Oncogene*. — 2006. — Vol. 25 — P. 1922–1930.
3. Delitto D., Vertes-George E., Hughes S.J., et al. c-Met signaling in the development of tumorigenesis and chemoresistance: potential applications in pancreatic cancer // *World J. Gastroenterol.* — 2014. — Vol. 20. — P. 8458–8470.
4. Farabegoli F., Govoni M., Spisni E., Papi A. EGFR inhibition by (-)-Epigallocatechin-3-gallate and IIF treatments reduces breast cancer cell invasion // *Biosci. Rep.* — 2017. — May 2. pii: BSR20170168. doi: 10.1042/BSR20170168.
5. Gasparetto J.C., Peccinini R.G., de Francisco T.M., Cerqueira L.B., Campos F.R., Pontarolo R. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10. — No. 3. — e0118922.
6. Gherardi E., Birchmeier W., Birchmeier C., et al. Targeting MET in cancer: rationale and progress // *Nat. Rev. Cancer*. — 2012. — Vol. 12. — P. 89–103.
7. Guon T.E., Chung H.S. Hyperoside and rutin of *Nelumbo-nucifera* induce mitochondrial apoptosis through a caspase-dependent mechanism in HT-29 human colon cancer cells // *Oncol. Lett.* — 2016. — Vol. 11. — No. 4. — P. 2463–2470.
8. Kang N.J., Shin S.H., Lee H.J., Lee K.W. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis // *Pharmacol. Ther.* — 2011. — Vol. 130. — No. 3. — P. 310–324.
9. Karakurt S. Modulatory effects of rutin on the expression of cytochrome P450s and antioxidant enzymes in human hepatoma cells // *Acta Pharm.* — 2016. — Vol. 66. — No. 4. — P. 491–502.
10. Koh Y.W., Choi E.C., Kang S.U., Hwang H.S., Lee M.H., Pyun J.H., Park R.H., Lee Y.D., Kim C.H. Green tea (-)-epigallocatechin inhibits HGF-induced progression in oral cavity cancer through suppression of HGF/c-MET // *J. Nutrit. Biochem.* — 2011. — Vol. 22. — P. 1074–1083.
11. Lambert J.D., Lee M.-J., Diamond L., Ju J., Hong J., Bose M., Newmark H.L., Yang C.S. Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues // *Drug Metabolism and Disposition*. — 2006. — Vol. 34. — No. 1. — P. 8–11.
12. Li F., Zhang X., Li Y., Lu K., Yin R., Ming J. Phenolics extracted from tartary (*Fagopyrum tartaricum* L. Gaerth) buckwheat bran exhibit antioxidant activity, and an antiproliferative effect on human breast cancer MDA-MB-231 cells through the p38/MAP kinase pathway // *Food Funct.* — 2017. — Vol. 8. — No. 1. — P. 177–188.
13. Liu Y., Lang T., Jin B., Chen F., Zhang Y., Beuerman R.W., Zhou L., Zhang Z. Luteolin inhibits colorectal cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition by suppressing CREB1 expression revealed by comparative proteomics study // *J. Proteomics*. — 2017. — Vol. 161. — P. 1–10.
14. Lu J., Li G., He K., Jiang W., Xu C., Li Z., et al. Luteolin exerts a marked antitumor effect in cMet-overexpressing patient-derived tumor xenograft models of gastric cancer // *J. Transl. Med.* — 2015. — Vol. 13. — P. 42–52.
15. Naran S., Zhang X., Hughes S.J. Inhibition of HGF/Met as therapy for malignancy // *Expert Opin. Ther. Targets*. — 2009. — Vol. 13. — P. 569–579.
16. Scagliotti G.V., Novello S., von Pawel J. The emerging role of MET/HGF inhibitors in oncology // *Cancer Treat Rev.* — 2013. — Vol. 39. — P. 793–801.
17. Vijay M., Sivagami G., Thayalan K., Nalini N. Radiosensitizing potential of rutin against human colon adenocarcinoma HT-29 cells // *Bratisl. Lek. Listy*. — 2016. — Vol. 117. — No. 3. — P. 171–178.
18. Zang M., Hu L., Fan Z. et al. Luteolin suppresses gastric cancer progression by reversing epithelial-mesenchymal transition via suppression of the Notch signaling pathway // *J. Transl. Med.* — 2017. — Vol. 15. — P. 52–63.

Список сокращений:

MET — рецептор мезенхимо-эпителиального перехода;
 HGF — фактор роста гепатоцитов;
 ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход;
 Акат — аденокарцинома тонкой кишки;
 EGCG — эпигаллокатехин-3-галлат;
 ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;
 МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид.

TESTING OF POLYPHENOLS FOR TARGET THERAPY OF TYROSINE KINASE RECEPTOR MET IN THE CELL CULTURE OF SMALL INTESTINE ADENOCARCINOMA

G.M. ARTYKBAEVA, Z.S. KHASHIMOVA, I.R. YALALOVA, A.A. MAMADRAHIMOV

Acad. A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences, Republic of Uzbekistan

The receptor of mesenchymal-epithelial transition (MET) is a tyrosine kinase receptor which plays a significant role in the initiation and progression of malignant cells. Certain natural products show a potential inhibitory effect on the activation of MET. The aim of this work was to study the cytotoxic activity of herbal preparations in the cell culture of the small intestine adenocarcinoma Acat as well as their effect on the inhibition of the tyrosine kinase receptor MET. Aberrant phosphorylation of the receptor is the first step initiating a tumorigenic signal in carcinogenesis. All drugs (coumarin, catechin, epigallocatechin-3-gallate, luteolin, rutin) showed an antiproliferative effect in the suppression of Acat cells by the MTT method. Catechins and luteolin showed a significant inhibitory effect on the phosphorylation of MET. The greatest inhibitory effect in blocking the MET signal pathway had epigallocatechin-3-gallate.

Keywords: receptor MET, phosphorylation, cell culture Acat, polyphenols.

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЕ ХРАНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

Д.И. ПЕТРУХИНА, И.Н. ЛЫКОВ*

Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского, Калуга

Обобщены результаты исследований по эффективности криосохранения аксенного штамма *Arthrospira platensis* PCC 9108 и неаксенных штаммы *Arthrospira platensis* SAG 21.99 и SAG 257.80 при температуре -80°C в присутствии глюкозы. Исследованные штаммы *Arthrospira platensis* показали свою жизнеспособность после замораживания со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и хранения в течение одного месяца при температуре -80°C в присутствии раствора глюкозы. Наилучшие параметры роста аксенного и неаксенных штаммов *Arthrospira platensis* после криосохранения были получены с применением в качестве криопротектора 10%-ного раствора глюкозы.

Ключевые слова: цианобактерии, *Arthrospira platensis*, глюкоза, криоконсервация, удельная скорость роста.

Введение

Во многих областях промышленности востребованы штаммы рода *Arthrospira*, в особенности вид *Arthrospira platensis*, который культивируется в промышленных масштабах в некоторых странах (Muhling, 2000) [7]. Вид *Arthrospira platensis* присутствует во многих лабораторных коллекциях культур. Однако трудоемкое обслуживание большого количества штаммов в отсутствие общеприменимых методов долгосрочного хранения для вида *Arthrospira* является причиной ограниченного числа тестируемых штаммов *Arthrospira* sp. в исследованиях, а также представляет проблему для крупных коллекций культур. Так, при исследовании морфологических признаков штаммов *Arthrospira* было задействовано 24 штамма (Jeeji Bai, Seshadri, 1980) [5], а при исследовании состава жирных кислот использовали 18 штаммов *Arthrospira* (Cohen, Vonshak et al., 1987) [3]. Другие исследовательские группы задействуют меньшее количество штаммов *Arthrospira* (Viti, Ventura et al., 1997) [9].

Целью нашего исследования было тестирование возможности низкотемпературного хранения нескольких штаммов *Arthrospira platensis*, полученных из разных

коллекций культур. Основным критерием для низкотемпературного хранения является его применимость для всех исследуемых штаммов *Arthrospira platensis*. Для этого нами изучалась возможность использования глюкозы в качестве криопротектора и осуществлялся подбор ее оптимальной концентрации.

Материалы и методы

В исследование были включены: аксенный штамм *Arthrospira platensis* PCC 9108 из коллекции культур Университета Пастера (Франция) и неаксенные штаммы *Arthrospira platensis* SAG 21.99 и SAG 257.80 из коллекции культур Геттингенского университета (Германия). Штамм *Arthrospira platensis* PCC 9108 идентичен штамму *Arthrospira platensis* CCMR 1295 из коллекции культур морского фитопланктона (США).

Культуры штаммов *Arthrospira platensis* выращивали на стандартной жидкой питательной среде Заррука при температуре 30°C в колбах Эрленмейера с постоянным перемешиванием (110 оборотов в минуту). Интенсивность освещения составила 21 мкмоль фотонов/ $(\text{м}^2\text{с})$ с циклом 16 ч свет и 8 ч ночь.

Концентрацию сухой биомассы (Сх) штаммов *Arthrospira platensis* рассчитывали из оптической плотности их клеточной суспензии (Е) при длине волны 750 нм (Cogne, Lehmann et al. 2003) [2]. Оптическую плотность измеряли на UV/VIS-спектрофотометре Beckman DU 640 (Фирма Beckman-Coulter, США) в видимой области спектра (200–800 нм). Запись проводили на скорости 1 нм/сек. Для удобства расчета Сх для каждого штамма *Arthrospira platensis* была по-

© 2017 г. Петрухина Д.И., Лыков И.Н.

* Автор для переписки:

Лыков Игорь Николаевич

доктор биол. наук, профессор, директор Института естествознания ФГБОУ ВПО «Калужский государственный университет имени К.Э. Циолковского», заведующий кафедрой ботаники, экологии и микробиологии

E-mail: linprof47@yandex.ru

строена калибровочная кривая. График калибровочной кривой представляет собой зависимость оптической плотности суспензии штаммов *Arthrospira platensis* от концентрации их сухой биомассы. Поскольку пигменты, входящие в состав цианобактерий, не поглощают излучения при длине волны в 750 нм, показания оптической плотности при 750 нм отражают плотность суспензии клеток, которая с определенной точностью коррелирует со значением сухой биомассы. Содержание сухого вещества в культурах штаммов *Arthrospira platensis* для построения калибровочной кривой определяли весовым методом на фильтрах из ацетата целлюлозы. Фильтры с биомассой штаммов *Arthrospira platensis* дважды промывали стерильной дистиллированной водой для удаления солей культуральной среды и высушивали при 103 °С до постоянного веса.

Соотношение между оптической плотностью и концентрацией сухой биомассы определяли для каждого штамма *Arthrospira platensis* по формуле 1:

$$C_x = E_{750 \text{ нм}} \times K \text{ [г/л]}, \quad (1)$$

где: $E_{750 \text{ нм}}$ — оптическая плотность клеточной суспензии при длине волны 750 нм,

K — коэффициент корреляции для каждого исследуемого штамма.

Удельную скорость роста штаммов *Arthrospira platensis* μ [час⁻¹] вычисляли по формуле 2:

$$\mu = \ln(C_{xt}/C_{x0})/t, \quad (2)$$

где C_{xt} и C_{x0} — текущая и начальная величины биомассы штамма *Arthrospira platensis* (г/л),

t — время (час).

Клетки штаммов *Arthrospira platensis* после 12 дней культивации криоконсервировали при температуре -80 °С с использованием контейнера «Mr. Frosty» от компании Nalgene, который обеспечивает медленное замораживание со скоростью 1 °С в минуту. Все процедуры проводили в стерильных условиях. Перед процедурой клетки штаммов *Arthrospira platensis* центрифугировали 10 минут при 4 °С с 2000 оборотами в минуту, супернатант удаляли, а клеточный осадок дважды промывали стерильной дистиллированной водой. Полученный клеточный осадок смешивали со свежей жидкой питательной средой Заррука до конечной клеточной оптической плотности 0,6. Непосредственно перед процессом криоконсервации к полученной клеточной суспензии штаммов *Arthrospira platensis* добавляли равный объем стерильного раствора глюкозы. Клетки в растворе глюкозы инкубировали при 4 °С в темноте в течение 20 минут при постоянном перемешивании. После инкубирования смесь клеток и

криопротектора в количестве 1,8 мл пипетировали в криофлаконы (полипропиленовые с завинчивающейся крышкой, фирмы Nalgene) объемом 2 мл. Далее криофлаконы помещали в контейнер «Mr. Frosty», предварительно охлажденный до 4 °С. Затем контейнер помещали в морозильную камеру при температуре -80 °С. Через 1,5 часа криофлаконы перемещали из контейнера в пластиковые боксы и хранили далее при -80 °С. Каждая проба имела свою индивидуальную маркировку. Конечная концентрация раствора глюкозы в образцах была 5, 10 и 15%.

После изъятия образцов штаммов *Arthrospira platensis* из морозильной камеры проводили непосредственное размораживание. Для этого пробы с криоконсервированными образцами штаммов *Arthrospira platensis* выдерживали в течение 2–3 минут на водяной бане при температуре 37 °С. Оттаявшие образцы штаммов *Arthrospira platensis* инокулировали в стерильную колбу Эрленмейера с 5 мл свежей стандартной питательной среды Заррука при комнатной температуре.

Клетки штаммов *Arthrospira platensis* культивировали при тех же условиях, что и контрольные культуры. Однако чтобы предотвратить фотоокисление, их культивировали в течение первых 40 мин в темноте при комнатной температуре, затем 2 часа при тусклом свете и комнатной температуре, и, наконец, в исходных условиях при 30 °С. После культивирования в течение 40 мин в темноте были добавлены еще 5 мл стандартной питательной среды Заррука для достижения начальной клеточной концентрации.

Результаты и обсуждение

Для быстрого определения концентрации биомассы штаммов *Arthrospira platensis* строили калибровочные кривые зависимости количества сухой биомассы штаммов *Arthrospira platensis* (y) от оптической плотности суспензии (x). Построив корреляционное поле в программе MS Excel, делали вывод о линейной связи данных показателей (рис. 1), а также рассчитывали результаты регрессионной статистики (коэффициент корреляции и коэффициент детерминации R^2).

Полученные коэффициенты корреляции, необходимые для расчета концентрации биомассы трех штаммов *Arthrospira platensis*, обобщены в таблице 1. В литературе мы встречали различные значения коэффициента корреляции для расчета зависимости количества сухой биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* от оптической плотности суспензии.

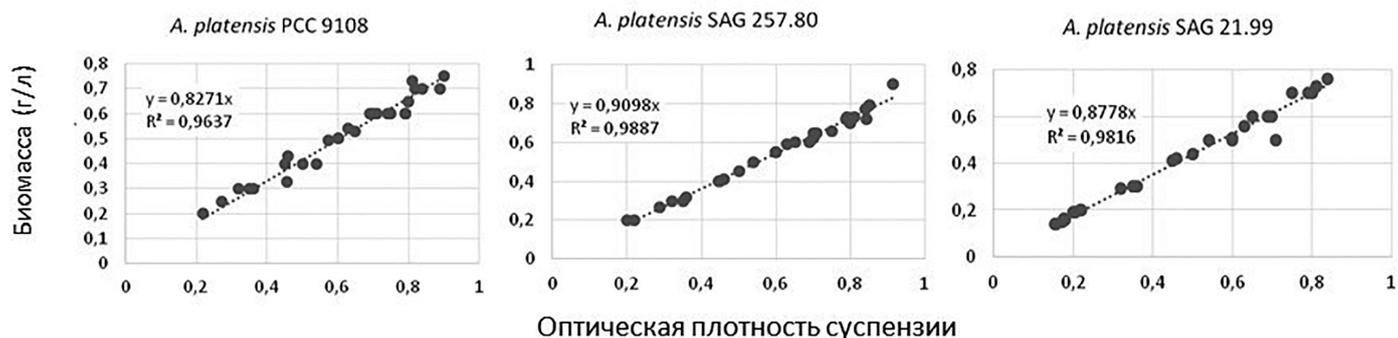


Рис. 1. Зависимость количества сухой биомассы штаммов *Arthrospira platensis* от оптической плотности суспензии (длина волны 750 нм)

Литературные данные показывают (табл. 2), что значения коэффициента корреляции видоспецифичны и зависят от оборудования; поэтому коэффициент корреляции количества сухой биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* в зависимости от оптической плотности суспензии должен быть определен индивидуально для каждого исследуемого штамма, что и было осуществлено нами.

Исследование ростовых параметров трех штаммов *Arthrospira platensis* показало, что к концу культивирования наибольшая концентрация биомассы (1,14 г/л) была у штамма SAG 257.80, а самая низкая концентрация биомассы (0,64 г/л) — у штамма SAG 21.99 (табл. 3). Наибольшие значения средней продуктивности у всех штаммов наблюдались на второй день культивирования. Но у штамма SAG 257.80 она была максимальной (0,0044 г/л в час).

Далее нами были определены ростовые параметры исследуемых штаммов *Arthrospira platensis*, которые рекультивировали после хранения в течение одного месяца при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в присутствии раствора глюкозы в качестве криопротектора (табл. 4).

Исследование показало, что после низкотемпературного хранения в течение месяца с раствором глюкозы в качестве криопротектора все исследуемые штаммы *A. platensis* были жизнеспособны. Однако их ростовые характеристики после оттаивания варьировали в зависимости от использованной концентрации раствора глюкозы. Наилучшие показатели для всех исследуемых штаммов *A. platensis* были получены после криохранения в присутствии 10%-ного раствора глюкозы.

Заключение

На основании проведенного исследования делаются следующие выводы:

1. Все протестированные штаммы *Arthrospira platensis* были жизнеспособны после хранения в течение одного месяца при постоянной температуре в $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ с раствором глюкозы в качестве криопротектора с концентрациями от 5 до 15%.

2. Наилучшие параметры роста штаммов *Arthrospira platensis* после криоконсервации и оттаивания были получены с применением в качестве криопротектора 10%-ного раствора глюкозы.

Таблица 1

Корреляция оптической плотности суспензии штаммов *Arthrospira platensis* для расчета концентрации биомассы (длина волны 750 нм)

Штамм <i>A. platensis</i>	Коэффициент детерминации (R^2)	Коэффициент корреляции
PCC 9108	0,96	0,82
SAG 257.80	0,98	0,92
SAG 21.99	0,98	0,90

Таблица 2

Коэффициенты корреляции в работах других авторов

Автор	Длина волны, нм	Коэффициент корреляции
Aiba, Ogawa, 1977 [1]	560	0,696
Leduy, Therien, 1977 [6]	560	0,26
Cogne et al., 2003 [2]	750	0,9
Sanchez-Luna et al., 2006 [8]	560	0,58
Costa et al., 2003 [4]	670	Не указан

Результаты исследования ростовых параметров штаммов *Arthrospira platensis*

Штамм <i>A. platensis</i>	Концентрация биомассы [г/л]		Максимальная скорость роста [час ⁻¹]	День достижения максимальной скорости роста	Средняя продуктивность [г/л в час]
	Начальная	Конечная			
PCC 9108	0,13±0,01	0,95±0,03	0,01±0,0011	2	0,0034±0,0003
SAG 257.80	0,19±0,02	1,14±0,04	0,01±0,0015	2	0,0044±0,0004
SAG 21.99	0,13±0,01	0,64±0,02	0,01±0,0012	2	0,0026±0,0002

Параметры роста культур штаммов *Arthrospira platensis* после хранения в течение одного месяца при температуре -80 °С

Штамм <i>A. platensis</i>	Концентрация биомассы [г/л]		Максимальная скорость роста [час ⁻¹]	На какой день культивирования достигается макс. скорость роста	Средняя продуктивность [г/л в час]
	Начальная	Конечная			
В присутствии 5%-ного раствора глюкозы					
PCC 9108	0,054±0,001	0,70±0,02	0,006±0,0011	3±1	0,0030±0,0011
SAG 257.80	0,061±0,003	0,81±0,03	0,005±0,0012	5±1	0,0035±0,0002
SAG 21.99	0,052±0,001	0,42±0,01	0,004±0,0020	5±1	0,0020±0,0005
В присутствии 10%-ного раствора глюкозы					
PCC 9108	0,054±0,002	0,75±0,02	0,008±0,0013	3±0,5	0,0030±0,0003
SAG 257.80	0,058±0,002	1,03±0,009	0,006±0,0011	4±1	0,0038±0,0003
SAG 21.99	0,054±0,003	0,53±0,01	0,006±0,0009	4±1	0,0020±0,0004
В присутствии 15%-ного раствора глюкозы					
PCC 9108	0,056±0,003	0,63±0,01	0,007±0,0011	3±1	0,0026±0,0004
SAG 257.80	0,056±0,001	0,79±0,02	0,004±0,0014	5±1	0,0031±0,0003
SAG 21.99	0,058±0,001	0,40±0,02	0,003±0,0010	5±1	0,0016±0,0002

Литература

1. Aiba S., Ogawa T. Assessment of growth yield of a blue-green alga: *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture // J. Gen. Microbiol. — 1977. — Vol. 102. — P. 179–182.
2. Cogne G., Lehmann B., et al. Uptake of macrominerals and trace elements by the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis* PCC 8005) under photoautotrophic conditions: Culture medium optimization // Biotechnology and Bioengineering. — 2003. — Vol. 81(5). — P. 588–593.
3. Cohen Z., Vonshak A., et al. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions // Phytochemistry. — 1987. — Vol. 26(8). — P. 2255–2258.
4. Costa J.A.V., Colla L.M., Duarte P.F. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions // Z. Naturforsch. — 2003. — Vol. 58. — P. 76–80.
5. Jeeji Bai N., Seshadri C.V. On coiling and uncoiling of trichomes in the genus *Spirulina* // Algological Studies/ Archiv für Hydrobiologie. — 1980. — No. 26. — P. 32–47.
6. Leduy A., Therien N. An improved method for optical density measurement of semimicro blue-green alga *Spirulina maxima* // Biotechnol. Bioeng. — 1977. — Vol. 19. — P. 1219–1222.
7. Muhling M. Characterization of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. — Durham University. Doctoral thesis, 2000. — 307 p.
8. Sánchez-Luna L.D., Bezerra R.P., Matsudo M.C., Sato S., Converti A., de Carvalho J.C.M. Influences of pH, temperature and Urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: A kinetic and thermodynamic approach // Biotechnology and Bioengineering. — 2006. — Vol. 96(4). — P. 702–711.
9. Viti C., Ventura S., et al. Genotypic diversity and typing of cyanobacterial strains of the genus *Arthrospira* by very sensitive total DNA restriction profile analysis // Research in Microbiology. — 1997. — Vol. 148(7). — P. 605–611.

LOW-TEMPERATURE STORAGE OF VARIOUS STRAINS OF CYANOBACTERIA *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

DI. PETRUKHINA, I.N. LYKOV

K.E. Tsiolkovsky Kaluga State University, Kaluga

The results of studies on the efficiency of cryopreservation of the axial strain *Arthrospira platensis* PCC 9108 and non-axial strains of *Arthrospira platensis* SAG 21.99 and SAG 257.80 at a temperature of -80 °C in the presence of glucose are summarized. The investigated strains of *Arthrospira platensis* showed their viability after freezing at a rate of 1 °C/min and storage for one month at -80 °C in the presence of a glucose solution. The best growth parameters of the axenic and non-axial strains of *Arthrospira platensis* after cryopreservation were obtained using a 10% glucose solution as a cryoprotectant.

Keywords: cyanobacteria, *Arthrospira platensis*, glucose, cryopreservation, specific growth rate.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ В ТЕХНОЛОГИИ ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ

А.А. ЛЕЩЕНКО*, С.А. ШВЕЦОВ, В.В. КРУПИН, С.В. БАГИН, А.В. ЕЖОВ, А.Г. ЛАЗЫКИН,
С.В. ЛОГВИНОВ, Д.А. МОХОВ, В.В. БИРЮКОВ, А.Р. ЗИГАНШИН

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» МО РФ, Киров

Многочисленность влияющих факторов и их взаимосвязь при лиофилизации в технологии вакцины чумной живой обуславливают сложность протекания указанного процесса, и в случае неправильного их учета создаются предпосылки к получению препарата или низкого качества, или вообще не соответствующего требованиям. Целью настоящей работы явилась разработка математической модели процесса лиофилизации в технологии вакцины чумной живой. Установлено, что полученная модель оценки основных показателей качества полуфабриката и готового препарата обладает высокой надежностью и диагностической эффективностью, что позволяет использовать ее для контроля и управления процессами приготовления не только лиофилизированных, но и других форм лекарственных средств.

Ключевые слова: вакцина, биотехнологический процесс, факторный анализ, математическая модель.

Введение

Последние годы характеризуются напряженной эпидемиологической обстановкой в природных очагах чумы с увеличением заболеваемости людей в мире. Известно, что только на территории Российской Федерации имеются 11 активных природных очагов чумы площадью более 253 тыс. кв. км. При этом площади с эпизоотиями в природных очагах чумы на сегодняшний день составляют более 135 тыс. кв. км, а в риске заражения находятся свыше 20 тыс. человек [7]. Кроме того, недавние вспышки чумы в Кыргызстане (2013 г.), Китае (2014 г.) и России (2015 г.) показали, что эпидемическая ситуация, связанная с угрозой распространения инфекции, продолжает оставаться напряженной [1, 12].

Одним из обязательных противоэпидемических мероприятий по защите населения России от чумы при возникновении очагов заражения является специфическая профилактика с использованием единственного лицензированного препарата в мире — вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для

инъекций, ингаляций и накожного скарификационного нанесения на основе *Yersinia pestis* штамма EV линии НИИЭГ (далее вакцина чумная живая), обладающей высокой иммуногенностью и низкой реактогенностью [3, 5, 6, 8].

Технологический процесс получения вакцины чумной живой предусматривает выполнение ряда последовательных операций, направленных, в конечном итоге, на получение лиофилизата, соответствующего установленным нормативной документацией требованиям [2]. При этом вакцина должна содержать требуемое количество полноценных живых микробов вакцинного штамма, обеспечивающих необходимое количество иммунизирующих доз в упаковке, и полностью удовлетворять физико-химическим нормативам [11].

Необходимо отметить, что важным этапом в технологии вакцины чумной живой по-прежнему остается процесс сублимационного высушивания (лиофилизации), который в значительной мере влияет на качественные показатели готового препарата [10]. Многочисленность влияющих факторов и их взаимосвязь в процессе сублимационного высушивания обуславливают сложность протекания указанного процесса, и в случае неправильного их учета создаются предпосылки к получению препарата или низкого качества, или вообще не соответствующего требованиям. Это указывает на необходимость изучения закономерностей процесса лиофилизации и нахождения математических зависимостей, описывающих взаимосвязи между влияющими факторами и показателями качества

© 2017 г. Лещенко А.А., Швецов С.А., Крупин В.В., Багин С.В., Ежов А.В., Лазыкин А.Г., Логвинов С.В., Мохов Д.А., Бирюков В.В., Зиганшин А.Р.

* **Автор для переписки:**

Лещенко Андрей Анатольевич,

доктор технических наук, ведущий научный сотрудник Филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров)

E-mail: leshchenko58@mail.ru

готовой вакцины, с целью дальнейшей оптимизации процесса.

К настоящему времени математическое описание процессов лиофилизации не нашло широкого освещения в отечественной литературе, что послужило основанием для проведения соответствующих исследований и обсуждения полученных результатов.

С учетом изложенного целью настоящей работы явилась разработка математической модели процесса лиофилизации в технологии вакцины чумной живой.

Материалы и методы

Объектом исследования служили структура и характер многофакторных отношений между технологическими параметрами и показателями качества вакцины чумной живой, которые представляют собой цепь причин и следствий.

Предметом исследования было выявление из множества возможных причин «мнимых», якобы вызывающих брак, и «реальных» факторов, действительно ведущих к снижению качества вакцины. Оценку вклада отобранных «немногочисленных существенно важных» факторов в изменение качества продукции проводили методом математического моделирования.

Аналізу подвергалась технология получения вакцины чумной живой. В работе исследовалось 10 серий готовой формы вакцины и ее полуфабриката. База данных, характеризующих технологический процесс приготовления вакцины чумной живой, сформирована на основе результатов контроля основных стадий производства: приготовление вакцинной взвеси и ее обезвоживание. Каждая из стадий представлена в базе данных соответствующим набором характеристик, которые исследовались с использованием математического аппарата — факторного, дискриминантного и регрессионного анализов. Алгоритмы расчета целевых функций реализованы на ПЭВМ.

Для изучения влияния комплекса технологических факторов на качество готового препарата определяющим показателем была выбрана характеристика специфической активности — концентрация жизнеспособных клеток в вакцине.

При получении сокращенного математического описания объекта исследования применяли факторный метод анализа [9]. Для оценки вклада каждого параметра в действие определенного фактора использован графический метод, где обобщающие факторы представлены двумя осями, а параметры — векторами, проведенными

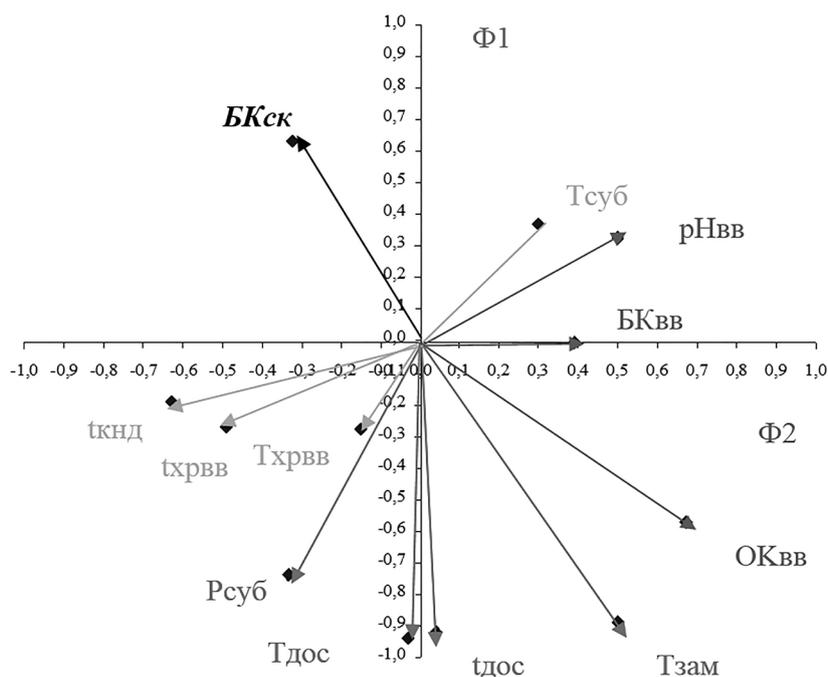
из начала координат в точки с координатами соответствующих факторных нагрузок.

Величины нагрузок измеряемых параметров на оси координат показывают степень их зависимости от определяющих факторов. Сумма квадратов нагрузок по каждому фактору составляет итоговый вклад параметров в суммарную дисперсию всех параметров. Основным (ведущим) фактором в системе считается тот, на который приходится большая доля общей дисперсии. Коэффициенты корреляций в факторном пространстве между параметрами равны произведению длин векторов, умноженных на косинус угла между ними. Вращение оси координат позволяет изменять нагрузки на факторы при неизменных коэффициентах корреляции между параметрами и суммарной дисперсии. Для интерпретации факторных решений угол вращения осей подбирали таким образом, чтобы графическое изображение имело вид, при котором параметры, характеризующие хорошо знакомые свойства системы, имели бы столь высокие нагрузки на соответствующий фактор, насколько это возможно. Полученная окончательная матрица нагрузок, объясняющая вариации отдельных параметров действием двух обобщающих факторов, дает возможность исключить из дальнейшего исследования параметры с минимальным влиянием. После отбора наиболее информативных показателей на их основе разрабатывали математическую модель соответствующей стадии биотехнологического процесса. Для этой цели использовали аппарат регрессионного анализа [4].

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного факторного анализа свидетельствуют, что не менее 50% (52,0) изменений всех параметров, характеризующих процесс лиофилизации, можно описать действием двух основных факторов: биологического (Φ_2), представляющего собой обобщенное влияние свойств биологического компонента, и технологического (Φ_1), представляющего собой обобщенное влияние группы технических параметров на формирование основного показателя качества — концентрации живых микробов.

Анализ показал, что технологический фактор является определяющим в формировании качества готовой формы вакцины. На его долю приходится большая часть «объясненной» дисперсии. На рисунках 1 и 2 представлены графики исходного, а также итогового факторных решений стадии лиофилизации в технологии вакцины чумной живой.



Обозначение фактора	Нагрузки параметров на факторы												Дисперсия, процент
	Номер и сокращенное обозначение параметров условий лиофилизации вакцины чумной живой												
	ρНвв	ОКвв	БКвв	Тхрвв	txрвв	Тзам	tkнд	Рсуб	Тсуб	Тдос	tdос	БКск	
Φ1 <small>технологический</small>	0,33	-0,57	0,0	-0,28	-0,27	-0,89	-0,19	-0,74	0,37	-0,94	-0,92	0,63	35,16
Φ2 <small>биологический</small>	0,5	0,67	0,39	-0,15	-0,49	0,5	-0,63	-0,33	0,3	-0,03	0,04	-0,32	16,80
	Итого:												51,96

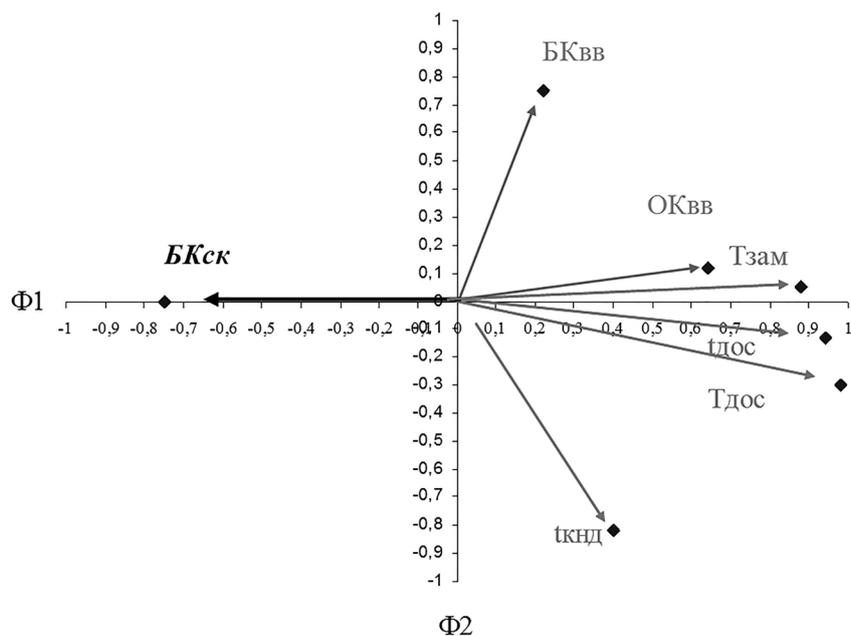
Рис. 1. Графическое изображение факторного решения процесса лиофилизации вакцины чумной живой. На графике обозначено — черным: БКск — концентрация жизнеспособных клеток в вакцине; желтым: Тсуб — продолжительность сублимации, tkнд — температура конденсатора, txрвв — температура хранения вакцинной взвеси, Тхрвв — продолжительность хранения вакцинной взвеси; зеленым: ρНвв — концентрация водородных ионов в вакцинной взвеси, БКвв — концентрация жизнеспособных клеток в вакцинной взвеси, ОКвв — общее содержание клеток в вакцинной взвеси; красным: Тзам — продолжительность замораживания, tdос — температура досушивания, Тдос — продолжительность досушивания, Рсуб — разрежение в сублимационной камере

На стадии приготовления лиофилизата (см. рис. 1) технологический фактор идентифицируется изменениями параметров, характеризующих условия сублимационного досушивания — продолжительность замораживания (Тзам), разрежение в сублимационной камере (Рсуб), продолжительность (Тдос) и температура досушивания (tdос). Изменение указанных векторов обратно направлению изменения фактора Φ1.

Параметры, определяющие условия подготовки вакцинной взвеси к досушиванию и режим ее замораживания, имеют низкие нагрузки на технологический фактор, что свидетельствует об их

малой значимости для пространства исследуемых признаков и является основанием для исключения из дальнейших расчетов.

Биологический фактор (Φ2) процесса досушивания идентифицируется векторами параметров, которые характеризуют свойства жидкого полуфабриката вакцины, такими как общее содержание клеток в вакцинной взвеси (ОКвв), концентрация в ней жизнеспособных клеток (БКвв) и ее кислотность (ρНвв). Биологический фактор определяет лишь 16,8% дисперсии параметров и поэтому его влияние на поведение системы менее значимо.



Обозначение фактора	Нагрузки параметров на факторы							Дисперсия, процент
	Номер и сокращенное обозначение параметров, характеризующие условия лиофилизации вакцины чумной живой							
	ОКвв	БКвв	Тзам	ткнд	Тдос	тдос	БКск	
Ф1 технологический	0,12	0,75	0,05	-0,82	-0,30	-0,13	0,00	19,2
Ф2 биологический	0,64	0,22	0,88	0,4	0,98	0,94	-0,75	52,0
	Итого:							71,2

Рис. 2. Итоговое графическое изображение факторного решения процесса лиофилизации вакцины чумной живой. На графике обозначено – черным: БКск – концентрация жизнеспособных клеток в вакцине; зеленым: БКвв – концентрация жизнеспособных клеток в вакцинной взвеси, ОКвв – общее содержание клеток в вакцинной взвеси; красным: Тзам – продолжительность замораживания, тдос – температура досушивания, Тдос – продолжительность досушивания, ткнд – температура конденсатора

Факторный анализ показал, что технологический и биологический факторы не равноценны по своему влиянию на сохранение жизнеспособной биомассы в культуре по завершении сублимационного высушивания (БКск). После определения векторов, которые имели наибольшую нагрузку на факторы, было составлено итоговое графическое решение, которое описывает 71,2% изменений всех параметров, характеризующих процесс обезвоживания вакцинной взвеси. На его основе сформировали пространство признаков, вносящих наибольший вклад в изменение показателя концентрации живых клеток в готовом препарате. Полученный набор признаков использовали в качестве исходных для математического описания процесса обезвоживания вакцинной взвеси. Итоговое факторное

решение, касающееся стадии приготовления лиофилизата, и аналитическое выражение модели представлены на рисунке 2 и аналитическом выражении (1).

$$BK_{ск} = 14,29 - 0,24 \cdot OK_{вв} + 2,69 \cdot BK_{вв} + 32,18 \cdot T_{дос} + 0,66 \cdot t_{дос}, \quad (1)$$

где БКск – концентрация жизнеспособных клеток в вакцине, млрд кл./см³;

14,29 – свободный член;

ОКвв – общее содержание клеток в вакцинной взвеси, млрд кл./см³;

БКвв – концентрация жизнеспособных клеток в вакцинной взвеси, млрд кл./см³;

Тдос – продолжительность досушивания, ч;

tдос – температура досушивания, °С.

Уравнение (1) имеет высокую сходимость с экспериментальными данными (коэффициент множественной регрессии равен 0,77 при критическом 0,71, а коэффициент детерминации — 0,59).

Заключение

Таким образом, разработанный подход к математическому описанию процесса лиофилизации в технологии вакцины чумной живой, предусматривающий выявление наиболее значимых показателей на основе исследования взаимосвязей в изучаемом многопараметрическом пространстве с использованием факторного анализа, продемонстрировал свою эффективность при решении задач моделирования биотехнологического процесса. Полученная модель оценки основных показателей качества полуфабриката и готового препарата обладает высокой надежностью и диагностической эффективностью, что позволяет использовать ее для контроля и управления процессами приготовления не только лиофилизированных, но и других форм лекарственных средств.

Литература

1. Балахонов С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И. и др. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические эпизоотологические аспекты. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 1. — С. 55–60.
2. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. — М.: КолосС, 2004. — 296 с.
3. Воробьев А.А., Лебединский В.А. Массовые способы иммунизации. — М.: Медицина, 1977. — 256 с.
4. Львовский Е.Н. Статистические методы построения эмпирических формул. — М.: Высшая школа, 1982. — 239 с.
5. Методические указания по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. МУ 3.1.3.2355-08. Утв. и введ. в действие с 1 июля 2008 г.
6. Микшиц Н.И., Кудрявцева О.М., Кутырев В.В. Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии. — 2015. — № 3. — С. 116–126.
7. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н. и др. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2016. — № 1. — С. 13–19.
8. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика чумы». СП 3.1.7.2492-09. Утв. и введ. в действие с 1 июля 2009 г.
9. Ташиц М.Г., Константинов В.М. Математические методы в эпизоотологии. — М.: Колос, 1975. — 176 с.
10. Тетерин В.В., Ежов А.В., Бирюков В.В. и др. Способ получения препарата на основе штамма чумного микроба. Патент РФ 2510825 опубл. 10.04.2014, Бюл № 10.
11. Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-9120-08 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, ингаляций и накожного скарификационного нанесения». Утв. 01.10.07.
12. Центральное-азиатский информационный портал. <http://www.news-asia.ru>.

MATHEMATICAL MODEL OF THE LYOPHILIZATION PROCESS IN A LIVE PLAGUE VACCINE TECHNOLOGY

A.A. LESHCHENKO, S.A. SHVETSOV, V.V. KRUPIN, S.V. BAGIN, A.V. EZHOV,
A.G. LAZYKIN, S.V. LOGVINOV, D.A. MOKHOV, V.V. BIRYUKOV, A.R. ZIGANSHIN

*Branch of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute»
of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov*

The wide range of influencing factors and their interrelation in the course of lyophilization in live plague vaccine technology causes the complexity of the stated process and, when being incorrectly assessed, creates the preconditions for obtaining the preparation of low quality or does not meet the requirements. The aim of this work is to develop a mathematical model of the lyophilization process in live plague vaccine technology. The resulting model for assessing significant parameters of quality of semi-manufactured and complete products was proved to be of high reliability and diagnostic efficiency that allows its use for monitoring and arranging the process of producing not only lyophilized, but also other forms of immunobiological preparations.

Keywords: vaccine, biotechnological process, factor analysis, mathematical model.

УГЛЕВОДНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЛЕКТИНОВ ГРИБОВ *FUSARIUM SOLANI*

РИШ.С. МУХАММАДИЕВ*, РИН.С. МУХАММАДИЕВ, Т.В. БАГАЕВА

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

Проведено исследование влияния поверхностных лектинов 18 изолятов грибов, принадлежащих к виду *Fusarium solani*, на взаимодействие с различными моно- и полисахарами. Обнаружены существенные различия в специфичности к углеводам между агглютинидами сапрофитных и фитопатогенных изолятов одного вида. Лектины фитопатогенных штаммов грибов избирательно взаимодействовали с моносахаридами, в то время как лектины сапрофитных штаммов — с полисахаридами и гликопротеинами. Так, большинство поверхностных агглютининов фитопатогенных штаммов *Fusarium solani*, способных поражать корни проростков гороха, показало селективную избирательность к связыванию с D-глюкуроновой кислотой (значения МИК составило от 2,3 до 9,4 мМ). Поверхностные агглютинины изолятов *F. solani* 12, *F. solani* 13, *F. solani* 15 и *F. solani* 17, имеющие наиболее высокий уровень фитопатогенной активности, были способны специфично связывать L-арабинозу (значение МИК = 0,6–18,8 мМ). Лектины сапрофитов *F. solani* 3 и *F. solani* 4 избирательно связывались с гликопротеинами фетуином и фибриногеном, тогда как лектины *F. solani* 7 и *F. solani* 10 проявляли специфичность к крахмалу и ксилану (0,63 мг/мл и 0,31 мг/мл, соответственно).

Ключевые слова: микромицеты, *Fusarium solani*, поверхностные лектины, активность, углеводная специфичность.

Введение

Среди фитопатогенных грибов, которые могут поражать широкий круг растений, в том числе более двухсот видов сельскохозяйственных растений, выделяют микромицеты рода *Fusarium* [3]. Из них наиболее встречаемым и вредоносным является вид *Fusarium solani*, возбудитель гнили корней пшеницы, гороха, фасоли, огурцов и томатов [4, 11]. Главная особенность микромицетов данного вида заключается в их способности продуцировать токсические вещества, включая и низкомолекулярные термически стабильные микотоксины, губительно действующие не только на растения, но и на человека и животных, вызывая у последних гипертрофию миокарда, микозы и прочие заболевания [2, 7, 12]. Такая агрессивность, главным образом, связана с их жизненной стратегией и широким диапазоном адаптационных возможностей. Способность образовывать хламидоспоры и наличие половой стадии позволяет данным грибам выживать в различных

условиях окружающей среды и активно участвовать в процессе поражения растений [1].

Патогенез растений и участвующие в этом факторы патогенности, а также возможность практического применения указанных соединений в сельском хозяйстве привлекают особое внимание исследователей [20, 30]. Необходимость управления таким процессом требует тщательных исследований механизмов, которые лежат в основе взаимодействия между фитопатогенным грибом или возбудителем заболевания и растением-хозяином. Одним из видов молекулярного механизма взаимодействия в этих системах является углевод-белковое узнавание, в котором немаловажную роль играют лектины.

Лектины — это белки, или гликопротеины, которые обладают способностью избирательно связываться с углеводными детерминантами на поверхности клеточных структур тканей и тем самым влиять на сигналы в биосистеме, приводя к передаче биологической информации [14, 17]. Они широко распространены в природе и определены у представителей различных царств: вирусов, бактерий, грибов, актиномицетов, растений, беспозвоночных и позвоночных животных [26]. Среди микромицетов образование лектинов установлено для таких видов, как *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus fumigatus*, *Arthrotrichum oligospora* [9, 10, 16, 24].

Отдельные работы зарубежных специалистов по изучению лектинов на микромицетах показывают, что

© 2017 г. Мухаммадиев Риш.С., Мухаммадиев Рин.С., Багаева Т.В.

* Автор для переписки:

Мухаммадиев Риш.С.

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

E-mail: public.mail@kpfu.ru

лектины, которые находятся на поверхности гиф микромицетов, способны участвовать в патогенезе растений [21, 24]. Особенно наглядно участие поверхностных структур в процессе патогенеза показано для систем «картофель-фитофтора», причем существенную роль в этом механизме взаимодействия играла углеводная специфичность лектинов [6, 8]. Отсутствие таких данных у микромицетов не дает правильно характеризовать многие процессы, в том числе при исследовании основ молекулярного взаимодействия грибов рода *Fusarium* с растениями.

В связи с этим целью настоящего исследования явились изучение и сравнительный анализ углеводной специфичности поверхностных лектинов сапрофитных и фитопатогенных штаммов грибов *Fusarium solani*.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выделены сапрофитные и фитопатогенные штаммы грибов *Fusarium solani*, выделенные с зерновых и овощных культур из почв различных районов Республики Татарстан (РТ). Штаммы фитопатогенов *F. solani* 1 и *F. solani* 8 были выделены из внутренних тканей клубня картофеля сорта Невский, все остальные — из дерново-подзолистой почвы территорий РТ. В экспериментах также использовались музейные культуры микромицетов данного вида кафедры биохимии и биотехнологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Штаммы, использованные в работе, ранее были исследованы нами на их фитопатогенность относительно действия на растения гороха и пшеницы.

Штаммы микромицетов культивировали на картофельно-глюкозной среде, содержащей (г/л): картофель 200,0 и глюкозу 20,0, при температуре 28 °С в течение 7 суток. Мицелий изучаемых грибов получали фильтрацией и промывкой буферным раствором [22].

Поверхностные лектины выделяли по методу, предложенному Седжало — Делмас с соавторами [25].

Для определения активности лектинов использовали реакцию агглютинации (РА) с нативными эритроцитами 1 группы крови человека [27]. Реакцию проводили в специальных планшетах для иммунологических реакций с U-образными лунками. Для этого в лунках планшета готовили серию последовательных двукратных разведений раствора лектинов по 25 мкл в каждую лунку и добавляли такое же количество 2%-ной суспензии эритроцитов. Реакционную смесь оставляли при 4 °С на 60 минут.

Титр лектина выражали как максимальное разведение его в буферном растворе, при котором наблюдается РА эритроцитов.

Эритроциты для РА получали, используя методику Луцка с соавторами [5]. Эритроциты трижды отмывали в Tris-HCl буфере (20 мМ, рН 7,2), а затем готовили 2% суспензию для дальнейших экспериментов.

Избирательную способность лектинов к взаимодействию с сахарами исследовали методом ингибирования реакции гемагглютинации (ГА) [27]. Анализ проводили в лунках иммунологического планшета с U-образными лунками. Углеводы вносили в лунки по 25 мкл (двукратно разведенные), затем добавляли равный объем раствора лектинов и смесь оставляли на 1 час при температуре 23–24 °С. После инкубации в реакционную смесь добавляли 50 мкл 2%-ной суспензии нативных эритроцитов человека и выдерживали в течение 1–2 часов при 4 °С. Углеводную специфичность лектинов выражали в значениях МИК, соответствующих минимальному содержанию углевода в растворе, которое было способно вызвать полное ингибирование реакции ГА. Начальные концентрации углеводов составляли 5 мг/мл — для сложных и 300 мМ — для простых сахаров.

Результаты и обсуждение

Одной из основных биохимических характеристик лектинов является их избирательная способность распознавать и обратимо взаимодействовать с разнообразными углеводами [19]. Это уникальное свойство служит основой их классификации, а также выявляет молекулярные механизмы патогенеза растений, в частности фузариоз. В связи с этим были проведены опыты по исследованию углеводной специфичности поверхностных лектинов сапрофитных и фитопатогенных штаммов микромицетов *Fusarium solani* методом ингибирования реакции ГА.

Результаты исследования показали, что поверхностные агглютинины, образуемые разными изолятами одного и того же вида микромицета, но существенно отличающихся степенью патогенности к растениям, различаются также и по способности специфично связываться с сахарами (табл. 1 и 2).

Большинство агглютининов фитопатогенов, которые поражали корни проростков гороха и пшеницы, обнаружило специфичность к D-глюкуроновой кислоте со значениями МИК от 2,3 до 9,4 мМ. Поверхностные агглютинины фитопатогенных изолятов *F. solani*, *F. solani* 6, *F. solani* 8, *F. solani* 12 и *F. solani* 15 проявляли специфичность к взаимодействию с L-фукозой (см. табл. 1).

Таблица 1

Специфичность лектинов фитопатогенных изолятов *Fusarium solani* к моно- и полисахаридам

Углеводы	<i>F. sol</i>	<i>F. sol 1</i>	<i>F. sol 6</i>	<i>F. sol 8</i>	<i>F. sol 12</i>	<i>F. sol 13</i>	<i>F. sol 15</i>	<i>F. sol 17</i>
L-арабиноза	НИ	НИ	>9,4 мМ	НИ	>18,8 мМ	>4,7 мМ	>0,6 мМ	>1,2 мМ
L-рамноза	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ	НИ	>18,8 мМ	НИ
L-фукоза	>0,6 мМ	НИ	>0,6 мМ	>75 мМ	>2,3 мМ	НИ	>1,2 мМ	НИ
D-раффиноза	НИ	>9,4 мМ	НИ	>18,8 мМ	НИ	НИ	НИ	НИ
D-манноза	НИ	НИ	>150 мМ	НИ	НИ	>18,8 мМ	НИ	НИ
D-галактоза	НИ	>0,6 мМ	НИ	>2,3 мМ	>1,2 мМ	НИ	>9,4 мМ	>9,4 мМ
N-ацетил D-галактозамин	НИ	>0,3 мМ	НИ	>0,6 мМ	НИ	НИ	НИ	НИ
D-глюкуроновая кислота	>2,3 мМ	НИ	НИ	НИ	>9,4 мМ	>1,2 мМ	>4,7 мМ	>2,3 мМ

Примечание: НИ – не ингибирует D-глюкозу, D-ксилозу, D-рибозу, D-лактозу, D-фруктозу, D-мальтозу, D-сахарозу, D-маннит, целлобиозу, хондроитин-6-сульфат, крахмал, ксилан

Лектины изолятов *F. solani 12*, *F. solani 13*, *F. solani 15* и *F. solani 17*, обладающих наиболее высоким уровнем фитопатогенности, показали специфичность к моносахариду L-арабинозе (МИК 0,6–18,8 мМ).

По данным литературы, специфичность к L-арабинозе ранее была установлена только для лектинов грамм-отрицательных бактерий *Ralstonia solanacearum* [28], губки *Pellina semitubulosa* [13] и дискомицетного гриба *Peziza sylvestris* [29]. Данный моносахарид, как и D-глюкуроновая кислота, играет важную структурную роль в связи с тем, что находится в составе многих полисахаридов клеточных стенок растений, включая клеточные стенки корней гороха.

Агглютинины изолятов *F. solani 1* и *F. solani 8*, которые были выделены из клубней картофеля, специфично связывали N-ацетил D-галактозамин, D-галактозу и D-раффинозу. N-ацетил D-галактозамин-связывающие лектины также были найдены как в низших, так и в высших грибах: *Aspergillus terricola*, *Aspergillus pulvinus* [27], *Rhizoctonia solani* [15] и *Grifola frondosa* [18], *Ciborinia camelliae* [23].

Лектины сапрофитных штаммов взаимодействовали со значительно меньшим числом углеводов. Большинство поверхностных агглютининов сапрофитных изолятов *F. solani* избирательно связывало полимерные соединения, а не мономеры (см. табл. 2).

Таблица 2

Специфичность лектинов сапрофитных изолятов *Fusarium solani* к моно- и полисахаридам

Углеводы	<i>F. sol 3</i>	<i>F. sol 4</i>	<i>F. sol 7</i>	<i>F. sol 10</i>
L-фукоза	>18,75 мМ	НИ	НИ	НИ
D-фруктоза	НИ	НИ	>37,5 мМ	НИ
сахароза	НИ	НИ	>75 мМ	НИ
крахмал	НИ	НИ	>0,63 мг/мл	НИ
ксилан	НИ	НИ	НИ	>0,31 мг/мл
фетуин	>0,04 мг/мл	>0,01 мг/мл	НИ	НИ
фибриноген	>0,16 мг/мл	>0,08 мг/мл	НИ	НИ

Примечание: НИ – не ингибирует D-глюкозу, L-арабинозу, L-рамнозу, D-ксилозу, D-рибозу, D-маннозу, D-лактозу, D-маннит, D-галактозу, D-раффинозу, D-сахарозу, N-ацетил D-галактозамин, D-глюкуроновую кислоту, целлобиозу, хондроитин-6-сульфат

Так, например, лектины сапрофитов *F. solani* 3 и *F. solani* 4 избирательно связывались с гликопротеинами фетуином и фибриногеном, в то время как лектины *F. solani* 7 и *F. solani* 10 проявляли специфичность к крахмалу и ксилану, соответственно.

Заклучение

Определение специфичности поверхностных лектинов по связыванию с углеводами показало различия между агглютинидами сапрофитных и фитопатогенных изолятов одного вида. Лектины фитопатогенных форм грибов избирательно взаимодействовали с моносахаридами, в то время как лектины сапрофитных форм — с полисахаридами и гликопротеинами.

Способность поверхностных лектинов фитопатогенных изолятов *Fusarium solani* к взаимодействию с D-глюкуроновой кислотой и L-арабинозой указывает на возможное участие данных моносахаридов при распознавании возбудителем гнили корней растения-хозяина. Дальнейшее изучение агглютининов указанных штаммов открывает возможности их применения в сельском хозяйстве.

Литература

1. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.Г., Левитин М.М., Новожилов К.В. Фузариоз зерновых культур // Защита и карантин растений. — 2011. — № 5. — С. 49–51.
2. Гагкаева Т.Ю., Левитин М.М., Санин С.С., Назарова Л.Н. Зараженность зерна и видовой состав грибов рода *Fusarium* на территории РФ в 2004–2006 годах // АГРО XXI. — 2009. — № 4–6. — С. 3–5.
3. Голиков Н.Н. Клещевина, устойчивая к фузариозу // Защита и карантин растений. — 2003. — № 3. — С. 44–45.
4. Горленко М.В. Жизнь растений. Грибы. — М.: Просвещение, 1976. — 479 с.
5. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцки А.Д. Лектины. — Львов: Высшая школа, 1981. — 156 с.
6. Маменко П.Н. Функции лектинов растений при абиотических и биотических стрессах // Физиология растений и генетика. — 2014. — Т. 46. — № 2. — С. 95–107.
7. Рыстаева Р.А., Орынбаев М.Б., Мамадалиев С.М. Поиск, выделение и изучение токсинопродуцирующих изолятов гриба рода *Fusarium* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2009. — № 2. — С. 22.
8. Шувалова Е.П. Лектины картофеля и их участие во взаимоотношениях картофеля и возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1991. — 24 с.
9. Barak R., Elad Y., Chet I. The properties of L-fucose-binding agglutinin associated with the cell wall of *Rhizoctonia solani* // Archives of Microbiology. — 1986. — Vol. 144. — P. 346–349.
10. Barak R., Mirelman D., Chet I. Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii* // Phytopathology. — 1985. — Vol. 75. — No. 4. — P. 458–462.
11. Bogale M., Steenkamp E.T., Wingfield M.J., Wingfield B.D. Diverse *Fusarium solani* isolates colonize agricultural environments in Ethiopia // Eur. J. Plant Pathol. — 2009. — Vol. 124. — No. 3. — P. 369–378.
12. Carvajal-Moreno M. Mycotoxins that affect the human cardiovascular system // Journal of Biomolecular Research & Therapeutics. — 2015. — Vol. 6. — No. — P. 1–7.
13. Engel M., Bachmann M., Schroeder H.C., Rinkevich B., Kljajic Z., Uhlenbruck G., Müller W.E. A novel galactose and arabinose specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*. Isolation, characterization and immunological properties // Biochimie. — 1992. — Vol. 74(6). — P. 527–537.
14. Garner O.B., Baum L.G. Gakectin-glucan lattices regulate cell-surface glycoprotein organization and signaling // Biochem. Soc. Trans. — 2008. — Vol. 36. — No. 26. — P. 1472–1477.
15. Hamshou M., Van Damme E.J., Caccia S., Cappelle K., Vandendorpe G., Ghesquiere B., Gevaert K., Smagghe G. High entomotoxicity and mechanism of the fungal GalNAc/Gal-specific *Rhizoctonia solani* lectin in pest insects // Journal of Insect Physiology. — 2013. — Vol. 59(3). — P. 295–305.
16. Houser J., Komarek J., Kostlanova N., Cioci G., Varrot A., Kerr S.C., Lahmann M., Balloy V., Fahy J.V., Chignard M., Imberty A., Wimmerova M. A soluble fucose-specific lectin from *Aspergillus fumigatus* conidia-structure, specificity and possible role in fungal pathogenicity // PLoS One. — 2013. — Vol. 8. — No. 12. — P. 1–15.
17. Houser J. Structure-functional studies of lectins from pathogenic organisms: Ph.D. Dissertation. — Masaryk University: Faculty of Science National Centre for Biomolecular Research, Brno, 2014. — P. 1–98.
18. Kawagishi H., Nomura A., Mizuno T., Kimura A., Chiba S. Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies // Biochim. Biophys. Acta. — 1990. — Vol. 1034. — No. 3. — P. 247–252.
19. Khan F., Khan M. Fungal lectins: Current molecular and biochemical perspectives // Int. J. Biol. Chem. — 2011. — Vol. 5. — No. 1. — P. 1–20.
20. Khatib M., Lafitte C., Esquerré-Tugayé M.T., Bottin A., Rickauer M. The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways // New Phytologist. — 2004. — Vol. 162. — No. 2. — P. 501–510.
21. Larroque M., Ramirez D., Lafitte C., Borderies G., Dumas B., Gaulin E. Expression and purification of a biologically active *Phytophthora parasitica* cellulose binding elicitor lectin

- in *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. — 2011. — Vol. 80. — No. 2. — P. 217–223.
22. Muhammadiev R.S., Bagaeva T.V. Screening and partial characterization of new lectins from *Fusarium* sp. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. — 2015. — Vol. 6(5). — P. 1650–1657.
23. Otta Y., Amano K., Nishiyama K., Ando A., Ogawa S., Nagata Y. Purification and properties of a lectin from ascomycete mushroom, *Ciborinia camelliae* // Phytochemistry. — 2002. — Vol. 60(2). — P. 103–107.
24. Rosen S., Ek B., Rask I., Tunlid A. Purification and characterization of a surface lectin from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* // Journal of General Microbiology. — 1992. — Vol. 138(12). — P. 2663–2672.
25. Sejalon-Delmas N., Villalba F., Bottin A., Rickauer M., Dargent R., Esquerre-Tugaye M.T. Purification, elicitor activity, and cell wall localisation of a glycoprotein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, a fungal pathogen of tobacco // Phytopathology. — 1997. — Vol. 87. — No. 9. — P. 899–909.
26. Sharon N. Lectins: past, present and future // Biochem. Soc. Trans. — 2008. — Vol. 36. — Pt. 6. — P. 1457–1460.
27. Singh R.S., Tiwary A.K., Bhari R. Screening of *Aspergillus* species for occurrence of lectin activity and their characterization // J. Basic Microbiol. — 2008. — Vol. 48. — P. 112–117.
28. Sudakevitz D., Imberty N., Gilboa-Garber N. Production, properties and specificity of a new bacterial L-fucose and D-arabinose-binding lectin of the plant aggressive pathogen *Ralstonia solanacearum* and its comparison to related plant and microbial lectins // J. Biochem. — 2002. — Vol. 132(2). — P. 353–358.
29. Wang H., Ng T.B. First report of an arabinose specific fungal lectin // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2005. — Vol. 337(2). — P. 621–625.
30. Zhang Y., Yang X., Liu Q., Qiu D., Zhang Y., Zeng H. Purification of novel protein elicitor from *Botrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants // Microbiol. Research. — 2010. — Vol. 165. — No. 2. — P. 142–151. doi:10.1016/j.micres.2009.03.004.

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SURFACE LECTINS OF *FUSARIUM SOLANI*

RISH.S. MUKHAMMADIYEV, RIN.S. MUKHAMMADIYEV, T.V. BAGAYEVA

Kazan Federal University

In the present study, surface lectins of eighteen isolates of fungi belonging to *Fusarium solani* were tested for inhibition of hemagglutination activity against carbohydrates. Carbohydrate specificity of lectins showed differences in agglutinins between saprophytic and phytopathogenic isolates of the same species. Lectins of phytopathogenic fungi selectively interacted with monosaccharides, while lectins of saprophytic fungi — polysaccharides and glycoproteins. Majority of the surface lectins of phytopathogenic fungi were inhibited by D-glucuronic acid and L-arabinose (MIC=2,3–9,4 mM and MIC=0,6–18,8 mM, respectively). Fetuin and fibrinogen were inhibitory against lectins from saprophytic fungi of *F. solani* 3 and *F. solani* 4, whereas starch and xylan were observed to be strongest inhibitors of lectin from saprophytic fungi of *F. solani* 7 and *F. solani* 10 (minimum inhibitory concentration of 0,63 mg/ml and 0,31 mg/ml, respectively).

Keywords: fungi, *Fusarium solani*, surface lectins, activity, carbohydrate specificity.

СРЕДОУЛУЧШАЮЩИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ: *Ceratophyllum demersum* КАК ФАКТОР СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ВОДЕ

В.А. ПОКЛОНОВ*

Международный независимый эколого-политологический университет, Москва

Выявлен фиторемедиационный потенциал макрофита *Ceratophyllum demersum* (роголистник погруженный) при воздействии на него смеси восьми тяжелых металлов. Тяжелые металлы Zn, Cu, Pb, Cd, Fe⁺², Fe⁺³, Cr⁺⁶, Ni были добавлены в микрокосмы. Концентрации тяжелых металлов в воде микрокосмов определяли методом спектрофотометрии. После 365 дней (1 год) инкубации в воде микрокосмов с роголистником концентрации тяжелых металлов значительно снижались по сравнению с водой микрокосмов без растений. Обнаружена фитотоксичность исследованной смеси тяжелых металлов на макрофит *Ceratophyllum demersum*.

Ключевые слова: долгое взаимодействие, тяжелые металлы, биотехнология, фиторемедиация, микрокосмы, водные макрофиты, химическое загрязнение, фитотоксичность, очищение воды, цинк, медь, свинец, кадмий, железо, хром, никель, *Ceratophyllum demersum*.

Введение

В практической деятельности возникает задача лучше понимать и прогнозировать химико-биотические взаимодействия с участием химических веществ, загрязняющих окружающую среду, в том числе водную. Химико-биотические взаимодействия в биосфере [9] исследовались на многочисленных объектах, например, в случае различных неорганических и органических поллютантов с водными макрофитами [10–13].

Исследования многих лабораторий в РФ и за рубежом показывают, что тяжелые металлы проявляют токсичность для различных организмов, в том числе нарушают физиологические и биохимические процессы, в ряде систем оказывают генотоксичное и мембранотропное действие [9].

Изучение концентрирования элементов в объектах окружающей среды является важной частью исследований миграции элементов в биосфере. Биогенная миграция элементов [5, 6] представляет большой теоретический и практический интерес.

При значительных превышениях допустимых концентраций тяжелых металлов в донных отложениях происходит ингибирование жизненно важных процессов в бентосных организмах, что часто приводит к их болезни и гибели [4].

Тяжелые металлы (табл. 1) характеризуются наибольшей стабильностью и токсичностью для гидробионтов, выраженной способностью мигрировать в водных экосистемах, накапливаться в донных отложениях, водных организмах, длительно в них сохраняться и нарушать устойчивость водных биоценозов [7].

Водные экосистемы урбанизированных территорий как конечное звено миграции загрязняющих веществ испытывают значительное антропогенное воздействие, проявляющееся, в частности, в возрастании притока в них тяжелых металлов (см. табл. 1) и биогенных элементов. Биогеохимический круговорот элементов, формирующийся в водной экосистеме с учетом складывающейся в ее рамках окислительно-восстановительной обстановки, определяется прежде всего сбалансированностью экогеологических процессов в системе «водная среда — биота — донные отложения». Нарушение указанного равновесия внутри водоема под влиянием поступления в него загрязняющих веществ может привести к потере водной экосистемой способности к самоочищению воды и самовосстановлению [8].

В водоемах и водотоках осуществляются сложные взаимосвязи между биотой и качеством воды, в которых важная роль принадлежит водным организмам, в том

© 2017 г. Поклонов В.А.

* **Автор для переписки:**

Поклонов Владислав Александрович

кандидат биол. наук,

заведующий лабораторией водоподготовки, водоочистки и экологического мониторинга водных объектов, Международный независимый эколого-политологический университет им. Н.Н. Моисеева

E-mail: warvir@rambler.ru

числе водным высшим растениям. Водные растения исследуются с перспективой разработки биотехнологий очищения компонентов окружающей среды (фиторемедиация). Такие растения можно рассматривать в качестве естественных очистителей воды [10].

К возможным источникам загрязнения биосферы тяжелыми металлами относят предприятия черной и цветной металлургии (аэрозольные выбросы, загрязняющие атмосферу, промышленные стоки, загрязняющие поверхностные воды), машиностроения (гальванические ванны меднения, никелирования, хромирования, кадмирования), заводы по переработке аккумуляторных батарей, автомобильный транспорт [1].

Цель настоящей работы — выявить фитотоксичность и фиторемедиационный потенциал макрофита *Ceratophyllum demersum* (роголистник погруженный) при долгосрочном взаимодействии со смесью восьми тяжелых металлов (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe⁺², Fe⁺³, Cr⁺⁶, Ni).

Эти тяжелые металлы находятся в сбросах гальванических цехов отрасли машиностроения в использованных в работе концентрациях (примерно).

Материал и методы

Выбор вида растения (*Ceratophyllum demersum*) был связан с наблюдениями, которые показали наличие значительной биомассы этого растения в загрязненных водоемах, что свидетельствовало о его способности выдерживать определенные уровни загрязнения воды в реально наблюдаемых условиях.

Данный вид макрофита был отобран из экологически чистого водоема в восточном Подмоскowie (на границах Орехово-Зуевского и Шатурского районов).

Использован исходный раствор восьми тяжелых металлов (8 ГМ), содержащий меди Cu — 61,9 мг/л; железа Fe⁺³ — 50 мг/л; никеля Ni — 37 мг/л; железа Fe⁺² — 30 мг/л; цинка Zn — 25,8 мг/л; хрома Cr⁺⁶ — 22 мг/л; свинца Pb — 2,7 мг/л; кадмия Cd — 1,5 мг/л; Значение pH раствора составляло 5,0.

В состав микрокосмов входили следующие компоненты: отстоянная водопроводная вода (ОВВ) по 2500 мл; раствор восьми металлов (8М) добавляли по 100 мл (см. табл. 1).

Инкубация была начата 29.09.2015 г. и длилась 365 дней (1 год) до 28.09.2016 г. Инкубировали в лабораторных условиях при температуре 20±2 °С при естественной фотопериодичности.

Концентрации тяжелых металлов меди, цинка, свинца, кадмия, никеля, хрома и железа (общего) в

водной среде измеряли методом спектрофотометрии на спектрофотометре HACH DR/2010. Спектрофотометр HACH DR/2010 позволяет измерять концентрацию различных элементов и соединений во всех типах вод. Прибор соединяет в себе достижения микропроцессорной техники и современной оптики с отработанными методиками проведения анализов. Спектрофотометр DR/2010 внесен в Госреестр средств измерений под № 16493-97. При работе с DR/2010 не нужно заниматься калибровкой прибора, приготовлением стандартов и растворов реагентов. В памяти прибора запрограммированы калибровки, необходимые для контроля более 110 параметров.

Таблица 1

Состав микрокосмов

Номер микрокосма	Биомасса (сырой вес), г	ОВВ, мл	8М, мл
1А	Контроль без макрофитов	2500	100
1В	Контроль без макрофитов	2500	100
2А	68,5	2500	100
2В	67,8	2500	100
3А	Контроль с макрофитами 58,9	2500	Нет добавки
3В	Контроль с макрофитами 45,2	2500	Нет добавки

Результаты

Концентрации ионов металлов, созданные в воде микрокосмов в начале инкубации, были подобраны таким образом, что они превышали принятые в Российской Федерации величины ПДК для питьевой воды и для водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. В случае появления металлов в таких концентрациях в источниках водоснабжения, безусловно, возникает практическая необходимость в поисках средств для снижения их содержания в воде. Результаты экспериментов (табл. 3) показали, что для ионов всех металлов наблюдалось снижение концентраций. Если концентрации ионов вызовут гибель макрофитов, то после разрушения макрофитов ранее сорбированные ими ионы металлов могут выделяться в водную среду, что будет способствовать вторичному загрязнению водной среды.

Состояние микрокосмов

Календарное число	Номера микрокосмов	
	2А	2В
05.10.15	Пленка на поверхности воды, около 30% зеленых побегов, 20% листьев отделены от стеблей, тургор ослаблен, вода мутная	Пленка на поверхности воды, около 30% зеленых побегов, 10% листьев отделены от стеблей, тургор ослаблен, вода мутная
26.10.15	Пленка на поверхности воды исчезла, вода стала более прозрачной, на дне образовался детрит, около 95% погибло, 5% зеленых побегов	Пленка на поверхности воды исчезла, на дне образовался детрит, около 92% погибло, 8% зеленых побегов
5.11.15	Появился запах гнили, побеги либо лежат на дне, либо расположены в нижней части столба воды, 5% зеленых побегов	Появился запах гнили, побеги либо лежат на дне, либо расположены в нижней части столба воды, 8% зеленых побегов
30.11.15	Начали появляться новые побеги, зеленый цвет, запах гнили вода мутная. Около 2% новых побегов	Начали появляться новые побеги, зеленый цвет, запах гнили, вода мутная. Около 10% новых побегов
29.12.15	Старые побеги лежат на дне, продолжают появляться новые побеги, вода мутная, запах гнили	Старые побеги лежат на дне, продолжают появляться новые побеги, вода мутная, запах гнили
18.01.16	Еще больше новых побегов, запах гнили начал слабеть. 8% новых побегов	Еще больше новых побегов, запах гнили начал слабеть. 12% новых побегов
08.02.16	Запах гнили исчез, небольшая мутность. Несколько зеленых веток с побегами плавают в верхней части столба воды, небольшие частицы детрита плавают в толще воды, на дне детрит	Запах гнили исчез, небольшая мутность. Небольшие частицы детрита плавают в толще воды, на дне детрит, 12% новых побегов
09.03.16	Около 12% новых побегов. Бурые побеги начинают зеленеть. Присутствуют одноклеточные организмы	15% новых побегов, присутствуют одноклеточные организмы
29.03.16	16% новых побегов, вода начинает мутнеть	18% новых побегов, вода начинает мутнеть
11.04.16	18% новых побегов, вода мутная, запаха гнили нет	20% новых побегов, вода мутная, запаха гнили нет
25.04.16	20% новых побегов, вода мутная, много детрита на дне, много простейших организмов, неприятного запаха нет, появляются нитчатые водоросли	25% новых побегов, вода мутная, много детрита на дне, много простейших организмов, неприятного запаха нет, появляются нитчатые водоросли
10.05.16	Новые побеги перестали появляться, вода мутная, много детрита на дне, побеги расположены по всему столбу воды	Новые побеги перестали появляться, вода мутная, много детрита на дне, побеги расположены по всему столбу воды
20.06.16	Вода мутная с зеленоватым оттенком, побеги расположены по всему столбу воды	Вода мутная, побеги расположены по всему столбу воды
04.07.16	Побеги, которые появились после интоксикации металлами, лежат на дне, среди них 20% отмерших побегов, вода мутная	Побеги, которые появились после интоксикации металлами, лежат на дне, среди них 50% отмерших побегов, вода мутная
18.07.16	Побеги на дне, 80% отмерших побегов, появившихся после интоксикации, вода мутная, неприятного запаха нет	Побеги на дне, 80% отмерших побегов, появившихся после интоксикации, вода мутная, неприятного запаха нет
01.08.16	Побеги снова начали появляться, ветка роголистника выросла из детрита на 10 см за 7 суток, слабая мутность воды	Побеги снова начали появляться, мутность воды
30.08.16	Появились четыре новые ветки роголистника из детрита, побеги зеленые, неприятного запаха нет, мутность воды исчезла	Появилось пять новых веток роголистника из детрита, побеги зеленые, неприятного запаха нет, мутность воды исчезла
28.09.16	На дне много детрита, вода прозрачная, неприятного запаха нет, присутствует 10% побегов от первоначально добавленного веса фитомассы в начале опыта 28.09.15	На дне много детрита, вода прозрачная, неприятного запаха нет, присутствует 12% побегов от первоначально добавленного веса фитомассы в начале опыта 28.09.15

Была выявлена фитотоксичность смеси восьми тяжелых металлов (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe⁺², Fe⁺³, Cr⁺⁶, Ni) для водного макрофита (*Ceratophyllum demersum*) в условиях микрокосмов. Проведенные эксперименты показали, что после 7 суток (1 неделя) инкубации появились серьезные признаки неблагополучия. Спустя 30 суток (1 месяц) с начала инкубации почти все побеги погибли и появился гнилостный запах, но после 60 суток инкубации начали появляться новые побеги и качество воды со временем стало улучшаться (см. табл. 2).

Результаты экспериментов (см. табл. 3) показали, что для ионов всех металлов наблюдалось снижение

концентраций по сравнению с контролем (микрокосмы без растений).

В микрокосмах с растениями спустя 1 год после начала опыта вода соответствовала ПДК водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения по всем тяжелым металлам (Zn-цинк, Cu-медь, Pb-свинец, Cd-кадмий, Fe⁺²-железо, Fe⁺³-железо, Cr⁺⁶-хром) добавленным в микрокосмы, кроме никеля (Ni), превышение ПДК в 11 раз (см. табл. 3; табл. 4).

В микрокосмах с растениями вода соответствовала ПДК водоемов рыбохозяйственного назначения по 6 тяжелым металлам (Zn, Pb, Cd, Fe⁺², Fe⁺³, Cr⁺⁶). По меди (Cu) и никелю (Ni) были превышения ПДК.

Таблица 3

Средние значения концентраций тяжелых металлов после 365 суток (1 год) инкубации

№ микрокосма	Единицы измерения, концентрации металлов	Концентрации тяжелых металлов в указанных слева единицах						
		Cu	Zn	Ni	Fe ⁺² , Fe ⁺³ (общее)	Cr ⁺⁶	Pb	Cd
1А, 1В контроль (без растений)	мг/л	0,29	0,075	0,73	0,46	0,059	0,026	0,0085
2А, 2В	мг/л	0,065	0,01	0,22	0,11	0,012	0,0055	0,001
1А, 1В	% от контроля	100	100	100	100	100	100	100
2А, 2В	% от контроля	22,4	13,3	30,1	23,9	25,5	21,1	11,7

Примечание: в качестве контроля использовали микрокосмы №№ 1А и 1В без водных растений

Таблица 4

ПДК тяжелых металлов в воде [2, 3]

№	Анализируемые показатели	ПДК водоемов рыбохозяйственного назначения	ПДК водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения
1	Медь Cu, мг/л	0,001	1
2	Цинк Zn, мг/л	0,01	1
3	Свинец Pb, мг/л	0,006	0,01
4	Хром Cr ⁺⁶ , мг/л	0,02	0,05
5	Железо Fe, мг/л общее	0,1	0,3
6	Никель Ni, мг/л	0,01	0,02
7	Кадмий Cd, мг/л	0,005	0,001

В контрольных микрокосмах без растений, но с добавлением тяжелых металлов вода не соответствовала ПДК ни по одному показателю водоемов рыбохозяйственного назначения, лишь по меди и цинку были соответствия ПДК для водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения (см. табл. 3, 4).

Воду в микрокосмах взбалтывали перед взятием проб. В сосудах без растений поднимался желтый осадок. В микрокосмах с растениями со дна поднимался детрит.

При этом дополнительное измерение концентрации мышьяка и селена, которые при биотестировании не добавляли в водную среду микрокосмов, показало, что содержание этих элементов в воде микрокосмов и в опыте, и в контроле не различалось.

Побеги, находящиеся в микрокосмах без тяжелых металлов (контроль с растениями), к концу эксперимента (1 год) сохранили только 20% жизнеспособных побегов в микрокосме 2А и 15% в микрокосме 2В; 80 и 85% побегов были бурными и превратились в детрит на дне микрокосмов, соответственно.

Обсуждение

Для целей фиторемедиации большое значение имеет не только воздействие растений на концентрации металлов в водной среде, но и воздействие растворенных металлов на растения. Во втором случае может проявляться фитотоксичность металлов. Эта возможность должна исследоваться, поскольку она должна приниматься во внимание при разработке экологических технологий очищения воды.

В последнее время уделяется внимание разработке фундаментальных проблем экологии и гидробиологии, связанных с созданием теории функционирования водных экосистем. Развитием такого подхода является разработка элементов теории самоочищения воды в водных экосистемах. Выявлено, что в самоочищении воды участвуют многие гидробионты, в том числе водные растения [9]. Результаты данной работы вносят вклад в экспериментальные данные, которые детализируют упомянутую теорию самоочищения воды с участием многих гидробионтов, включая высшие водные растения.

Полученные результаты дополняют ранее проведенные исследования, в которых изучались фиторемедиационный потенциал и чувствительность к поллютантам других видов макрофитов, а именно: *Chara fragilis* L. (хара ломкая, семейство: Харовые — *Characeae* L.), *Elodea canadensis* Mchk. (семейство водокрасовые —

Hydrocharitaceae), *Potamogeton crispus* L. (семейство рдестовые — *Potamogetonaceae*), *Najas guadalupensis* L. (семейство наядовые — *Najadaceae*), *Fontinalis antipyretica* L. (семейство родниковые — *Fontinalaceae*), *Salvinia natans* L., *Salvinia auriculata* Aubl. (семейство сальвиниевые — *Salviniaceae*), *Lemna minor* L. (семейство ароидные — *Araceae*) [9–13, 14–20]. Выявленные факты вносят вклад в расширение знаний о роли макрофитов в комплексных биотических механизмах очищения воды и формирования ее качества в водоемах и водотоках, указывают на перспективность использования изученного вида (*Ceratophyllum demersum* L., семейство роголистниковые — *Ceratophyllaceae*) для целей фиторемедиации в условиях загрязнения воды металлами.

Впервые проведен опыт по долгосрочному взаимодействию смеси восьми тяжелых металлов и *C. demersum* в условиях экспериментальных систем.

В данном эксперименте был получен интересный факт, который заключался в том, что *C. demersum* может регенерировать свои отмершие побеги в условиях полиметаллического загрязнения воды.

Для уточнения характера влияния макрофитов в дальнейшем целесообразно провести дополнительные анализы с использованием других методов детектирования металлов.

Заключение

На основании проведенной работы можно сделать следующие выводы:

- выявлена способность высшего водного растения (*Ceratophyllum demersum*) способствовать снижению концентраций в водной среде восьми тяжелых металлов (Zn, Cu, Pb, Cd, Fe⁺², Fe⁺³, Cr⁺⁶, Ni);
- показана толерантность *C. demersum* при долгосрочном взаимодействии (1 год) со смесью восьми тяжелых металлов; роголистник оказался устойчивым к смеси тяжелых металлов и даже создал новые побеги во время эксперимента; к концу опытов в микрокосме 2А присутствовало 10%, в микрокосме 2В — 12% жизнеспособных побегов от первоначально добавленного веса фитомассы в начале опыта;
- полученные результаты могут использоваться при методической разработке вариантов биотестирования, для того чтобы оценить фитотоксичность тяжелых металлов, а также при разработке фиторемедиационных технологий очищения воды;

- можно отметить, что изложенные выше результаты проведенных опытов подтверждают и расширяют сведения о фиторемедиационном потенциале роголистника погруженного (*C. demersum*), который можно использовать на практике для разработки новых экотехнологий с целью снижения опасности комплексного загрязнения водной среды, что входит в число приоритетов современной экологии;
- новые данные представляют интерес в связи с возможностью определять устойчивость фиторемедиационных систем к нагрузкам тяжелых металлов.

Литература

1. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 5. — С. 23–29.
2. Гигиенические нормативы «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. ГН 2.1.5.1315-03». Источник: www.dioxin.ru/doc/gn2.1.5.1315-03.htm.
3. Гигиенические нормативы от 18 января 2010 года № 20 «Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения». Источник: www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/2070984/#ixzz4YfcglKzc.
4. Даувальтер В.А. Подходы к оценке экологического состояния поверхностных вод по результатам исследования донных отложений / Всеросс. конф. «Научные аспекты экологических проблем России». Тез. докл. — СПб.: Гидрометиздат, 2001.
5. Ивантер Э.В., Медведев Н.В. Экологическая токсикология природных популяций. — М.: Наука, — 2001. — 229 с.
6. Кураמיшина Н.Г., Курамин Э.М., Лапиков В.В. Комплексный экологический мониторинг водных экосистем в условиях техногенеза // Экологические системы и приёмы. — 2004. — № 8. — С. 9–11.
7. Куриленко В.В., Осмоловская Н.Г. Эколого-биогеохимическая роль макрофитов в водных экосистемах урбанизированных территорий (на примере малых водоемов Санкт-Петербурга) // Экология. — 2006. — № 3. — С. 163–167.
8. Майстренко В.Н., Хамитов Р.Э., Будников Г.К. Экологический мониторинг суперэкоотоксикантов. — М.: Химия, 1996. — 320 с.
9. Остроумов С.А., Поклонов В.А., Котелевцев С.В., Шестакова Т.В., Демина Л.Л., Шелейковский В.А. Средоулучшающие фитотехнологии: *Micranthemum umbrosum* и другие водные макрофиты как фактор снижения содержания в воде тяжелых металлов // Технологии живых систем. — 2013. — Т. 10. — № 1. — С. 53–57.
10. Остроумов С.А., Шестакова Т.В., Котелевцев С.В., Соломонова Е.А., Головня Е.Г., Поклонов В.А. Присутствие макрофитов в водной системе ускоряет снижение концентраций меди, свинца и других тяжелых металлов в воде // Водное хозяйство России: проблемы, технологии, управление. — 2009. — № 2. — С. 58–67.
11. Поклонов В.А., Остроумов С.А., Шестакова Т.В. Изучение химико-биотических взаимодействий макрофитов (*Utricularia gibba* L., *Echinodorus quadricostatus* Fasset, *Synnema triflorum* Kuntze, *Hydrotriche hottoniiflora* Zucc, *Lilaeopsis* sp.) с тяжелыми металлами (Cd, Zn, Cu, Pb), загрязняющими окружающую среду // Всероссийский журнал научных публикаций. — М.: Эстет, 2011. — С. 10–12.
12. Поклонов В.А. Удаление алюминия водными растениями *Ceratophyllum demersum* и *Chara fragilis* из воды экспериментальных экосистем // Экологическая химия. — 2016. — № 2. — С. 79–85.
13. Поклонов В.А. Фитотоксический эффект бензола в водной среде // Экологический вестник России. — 2015. — № 12. — С. 66–69.
14. Соломонова Е.А., Остроумов С.А. Биоэффекты воздействия додецилсульфата натрия на водные макрофиты // Водное хозяйство России: проблемы, технологии, управление. — 2006. — № 6. — С. 32–39.
15. Aravind P., Prasad M.N.V. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte // Plant Physiology and Biochemistry. — 2003. — Vol. 41(1). — P. 391–397.
16. Brown B.T., Rattigan B.M. Toxicity of soluble copper and other metal ions to *Elodea canadensis* // Environmental Pollution. — 1979. — Vol. 20. — P. 303–314.
17. Fritioff A., Kautsky L., Greger M. Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants // Environmental Pollution. — 2005. — Vol. 133. — P. 265–274.
18. Nyquist J., Greger M. Uptake of Zn, Cu, and Cd in metal loaded *Elodea canadensis* // Environmental and Experimental Botany. — 2007. — Vol. 60. — P. 219–226.
19. Rai U.N., Sinha S., Tripathi R.D., Chandra P. Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: Removal of heavy metals // Ecological Engineering. — 1995. — Vol. 5. — P. 5–12.
20. Zayed A., Gowthamam S., Terry N. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed // Journal of Environmental Quality. — 1997. — Vol. 27. — No. 3. — P. 715–721.

IMPROVED BIOTECHNOLOGY: *CERATOPHYLLUM DEMERSUM* AS A FACTOR IN REDUCING CONCENTRATIONS OF HEAVY METALS IN WATER

V.A. POKLONOV

International Independent Ecological and Political University, Moscow

The identified phytoremediation potential macrophyte *Ceratophyllum demersum* (hornwort), when exposed to mixture of eight heavy metals. Heavy metals Zn, Cu, Pb, Cd, Fe⁺², Fe⁺³, Cr⁺⁶, Ni was added to the microcosms. The concentrations of heavy metals in the water microcosms was determined by spectrophotometry. After 365 days (1 year) of incubation in microcosm water with hornwort, the concentrations of heavy metals decreased significantly compared with the water of the microcosms without plants. The author found phytotoxicity of the studied mixture of the heavy metals to macrophyte *Ceratophyllum demersum*.

Keywords: long interaction, heavy metals, biotechnology, phytoremediation, microcosms, aquatic macrophytes, chemical pollution, phytotoxicity, water purification, zinc, copper, lead, cadmium, iron, chromium, nickel, *Ceratophyllum demersum*.

ОЦЕНКА ПРОДУКТИВНОСТИ *MEDUSOMYCES GISEVII* С ПОМОЩЬЮ ВЕЛИЧИН pH И ЭЛЕКТРОПРОВОДИМОСТИ

В.В. РОГОЖИН*, Ю.В. РОГОЖИН

Якутская государственная сельскохозяйственная академия, Якутск

Изучена динамика pH и электропроводимости культуральной жидкости и определена масса бактериальной целлюлозы. Установлено, что во время культивирования симбионта происходит закисление среды, которое сопровождается понижением pH. При этом одновременно отмечается возрастание электропроводимости культуральной жидкости. Согласно данным корреляционного анализа, установлена обратная (отрицательная) связь между величинами pH и электропроводимости, свидетельствующая о том, что в культуральной среде преимущественно накапливаются карбоновые кислоты, концентрация которых проявляется в понижении pH и возрастании электропроводимости. В связи с этим нами впервые предложено для определения продуктивности *Medusomyces gisevii* в технологическом процессе, кроме потенциометрического метода, использовать кондуктометрический метод, который оказался прост в исполнении и очень чувствителен при проведении аналитических исследований по сравнению с традиционным pH-метрическим методом.

Ключевые слова: кондуктометрический метод, электропроводимость, микроорганизмы, бактерии, *Medusomyces gisevii*, бактериальная целлюлоза, симбиоз.

Введение

Medusomyces gisevii J. Lindau представляет собой сложное сообщество микроорганизмов, функционирование которого поддерживается за счет сложившихся ассоциативных структур разных микроорганизмов, находящихся в симбиозе [6]. Основным структурным элементом сообщества служит многослойная биопленка, являющаяся составной частью зооглеи, представленная преимущественно полисахаридом целлюлозой, которая локализуется на поверхности культуральной жидкости. Биопленка имеет вид плотного структурного образования, цвет которого определяется природой экстракта чая или другого красящего соединения. Верхняя часть биопленки обычно имеет гладкую или слегка шероховатую, блестящую поверхность, тогда как нижняя ее часть представлена многослойными, свисающими нитями. Именно в этом слое протекает деятельность симбиотического сообщества микроорганизмов, синтезируются органические кислоты и другие биогенные молекулы.

Синтез биопленки *Medusomyces gisevii* осуществляется бактериями *Gluconacetobacter xylinus*.

Видовой состав *Medusomyces gisevii* очень разнообразен и зависит от условий, места и времени культивирования. Продуцентами целлюлозы могут быть следующие бактерии: *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Sarcina*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes* и другие [2]. Поэтому изучение продуктивности и жизнедеятельности симбиотических сообществ микроорганизмов имеет не только производственное значение, но и общебиологическое [11].

Симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* широко используется в пищевом и фармацевтическом производствах. На основе культуральной среды симбионта готовят тонирующие напитки и лекарственные средства, так как вырабатываемые сообществом микроорганизмов вещества способны нормализовать деятельность человека и животных, подавляют рост патогенных бактерий, грибов и вирусов, обеспечивают организм биологически активными соединениями (витаминами, кислотами, ферментами и др.). Кроме того, компоненты культуральной жидкости симбионта обладают способностью стимулировать активность иммунной системы, проявляя иммуномодулирующее действие, а также имеют высокие антиоксидантные свойства, ингибируют образование свободных радикалов, в том числе и активных форм кислорода. Последнее действие обусловлено высоким содержанием в среде аскорбиновой кислоты и другими низкомолекулярными антиоксиданта-

© 2017 г. Рогожин В.В., Рогожин Ю.В.

* Автор для переписки:

Рогожин Василий Васильевич

доктор биол. наук,

профессор кафедры агробиохимии Якутской государственной сельскохозяйственной академии

E-mail: vrogozhin@mail.ru

ми [4]. Особенно рекомендуют использовать препараты культуральной жидкости *Medusomyces gisevii* для профилактики и лечения заболеваний, вызванных действием на организм антропогенных факторов окружающей среды [12]. В культуральной жидкости симбионта содержатся вещества, подавляющие развитие болезнетворных бактерий, восстанавливающие деятельность сердечно-сосудистой системы, предотвращающие возникновение простудных заболеваний [9].

Культуральную жидкость *Medusomyces gisevii* используют при производстве уксусной кислоты и плодово-ягодных соков, в том числе сока облепихи и полуфабрикатов спиртового брожения на основе зернового сырья [7], а также при производстве хлебобулочных изделий [3]. В связи с вышесказанным исследование симбиотического сообществ микроорганизмов *Medusomyces gisevii* имеет важное значение для деятельности различных пищевых производств.

Продуктивность микроорганизмов в процессе культивирования определяется по количеству субстрата, который образуется в результате их жизнедеятельности. При этом в реакторе обычно создаются оптимальные условия для роста и жизнедеятельности микроорганизмов. Во время культивирования в среде происходит постоянный рост бактерий, численность которых зависит от концентрации пищевого субстрата и замедляется при его истощении, либо при накоплении продуктов жизнедеятельности, ингибирующих рост микробной биомассы [5].

В процессе культивирования микроорганизмов в среде накапливаются соединения, несущие заряд. В частности, в процессе культивирования *Medusomyces gisevii* в среде накапливаются различные карбоновые кислоты и их производные (уксусная, глюконовая, щавелевая, лимонная, яблочная, пировиноградная, молочная, койевая, аскорбиновая и другие кислоты), а также биоорганические соединения (этиловый спирт, кофеин, моносахариды, дисахариды, гиалуроновая кислота, стерины, фосфатиды, жирные кислоты, витамины, белки, ферменты и др.) [4].

Поэтому для наблюдения за их количеством могут быть использованы потенциометрический и кондуктометрический методы. Метод рН-метрии позволяет специфично определять содержащиеся в среде H^+ -ионы [10]. Кондуктометрический метод является мало специфичным, так как основан на измерении электропроводности исследуемых растворов [8]. Электропроводность растворов зависит от природы и качественно-количественного состава соединений, а также от концентрации ионов, присутствующих в среде. Однако в определенных

условиях возможна прямая пропорциональность между этими величинами. Поэтому кондуктометрический метод может быть использован даже для количественного определения содержания различных соединений в исследуемой среде. Кроме того, кондуктометрический метод относится к простым в эксплуатации и высокочувствительным в определении различных заряженных частиц [1].

Целью данного исследования было изучить динамику рН и электропроводимость культуральной среды с *Medusomyces gisevii* и обосновать преимущество в использовании кондуктометрического метода для анализа продуктивности симбиотического сообщества микроорганизмов.

Материалы и методы

Исследования по определению электропроводности (W) были выполнены на кондуктометре СОМ-100, фирмы НМ Digital (Южная Корея). рН растворов измеряли на рН-метре ОР-211/1 (Венгрия), а массу биопленок определяли на весах фирмы Ohaus Corporation (США). В экспериментах с инокулятами использовалась искусственная питательная среда объемом 0,2 л, а в исследованиях по влиянию экстрактов — 1 л. В качестве углевода в среду культивирования микроорганизмов добавляли сахар (100 г/л), а также экстракты черного или зеленого чая (2 г/л) или кофе (2 г/л). Значения рН и W растворов питательных сред и исходных инокулятов показаны в таблице 1. Для калибровки кондуктометра использовали растворы КСl. В измерениях электропроводности растворов использовались величины ppm (мг/л).

Таблица 1
Величины рН и электропроводности (W) исходных растворов и инокулятов

Компонент среды	Исходные растворы		Инокулят	
	рН	W	рН	W
Зеленый чай	6,26	46	3,18	603
Черный чай	5,81	58	3,07	846
Кофе	5,74	120	3,11	1100

В качестве инокулятов использовались симбиотические культуры *Medusomyces gisevii*, выращенные на сахаре в соответствующем экстракте. При изучении влияния дозы инокулята его вносили в питательную среду 10—100%. При выполнении основных исследований по

культивированию микроорганизмов в питательную среду добавляли только 30% инокулята. Все исследования проводились при 23–25 °С в течение 30–40 суток. Все биологические эксперименты были выполнены в четырех аналитических повторностях. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы «Statistica».

Результаты и обсуждение

Для инициирования процесса роста *Medusomyces gisevii* в питательную среду добавляют инокулят, поэтому нами вначале были проведены исследования по изучению влияния процентного состава инокулята на рост симбиотических организмов (рис. 1 и 2). Видно, что во время культивирования симбионта происходит закисление среды, которое сопровождается понижением величины рН (рис. 1). При этом одновременно отмечается возрастание значений электропроводности культуральной среды (рис. 2). Наклон кривых рН и электропроводности зависит от величины процентного состава инокулятов. Чем меньше инокулята вносится в среду, тем проявляется больший наклон кривых как рН, так и электропроводности. Сглаженная динамика рН и электропроводности отмечается на кривых только при внесении в питательную среду больших количеств инокулята (70–100%).

Данные корреляционного анализа величин рН и электропроводности для различного процентного состава инокулятов приведены в таблице 2. Видно, что с возрастанием количества инокулята коэффициент корреляции между величинами рН и электропроводности начинает понижаться. При этом отмечается возрастание статистической ошибки коэффициента и показателей критерия Стьюдента. Поэтому согласно полученным данным, наиболее

оптимальными являются объемы инокулята, вносимые в питательную среду только в пределах 20–30%.

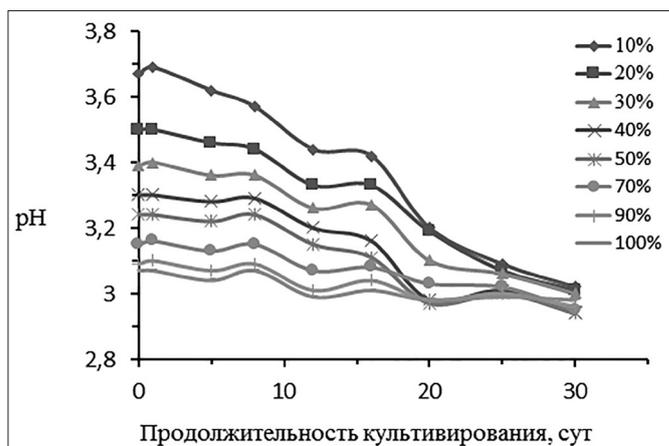


Рис. 1. Динамика рН в зависимости от времени культивирования инокулятов *Medusomyces gisevii* при разном их процентном содержании в питательной среде

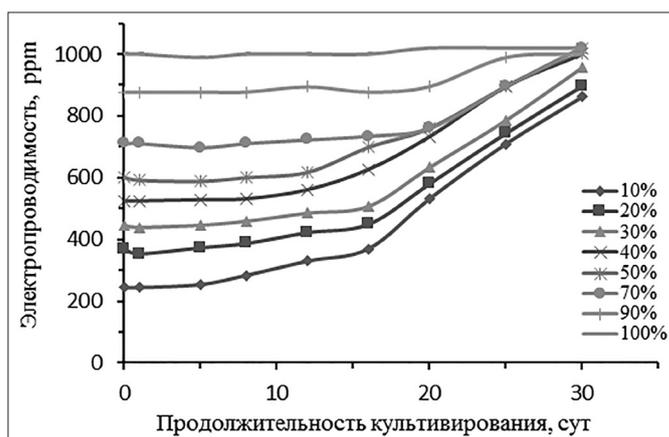


Рис. 2. Динамика электропроводности в зависимости от времени культивирования инокулятов *Medusomyces gisevii* при разном их процентном содержании в питательной среде

Таблица 2

Данные корреляционного анализа рН и электропроводности для инокулятов в питательной среде

Параметры	Объем инокулята в питательной среде, %							
	10	20	30	40	50	70	90	100
Коэффициент корреляции	-0,965	-0,969	-0,956	-0,929	-0,909	-0,875	-0,730	-0,684
Статистическая ошибка коэффициента	0,099	0,093	0,111	0,139	0,157	0,183	0,250	0,276
Критерий Стьюдента	9,766	10,41	8,593	6,656	5,780	4,781	2,832	2,483

Следует отметить, что рост микроорганизмов сопровождается появлением на поверхности культуральной среды бактериальной целлюлозы, масса которой может косвенно свидетельствовать об интенсивности протекаемого процесса (рис. 3). Видно, что масса биоцеллюлозы на 30-е сутки культивирования начинает активно увеличиваться при внесении в питательную среду инокулята более 20%. Поэтому в дальнейших своих исследованиях при изучении влияния различных экстрактов на рост *Medusomyces gisevii* в питательную среду добавляли только 30% инокулята.

На рисунке 4 и 5 представлены полученные нами данные по рН и с помощью кондуктометрического метода. Динамика кривых характеризует рост и продуктивность симбиотических микроорганизмов в исследуемый период времени. При этом следует отметить проявление более выраженной динамики на кривых электропроводимости по сравнению с динамикой кривых рН зависимостей.

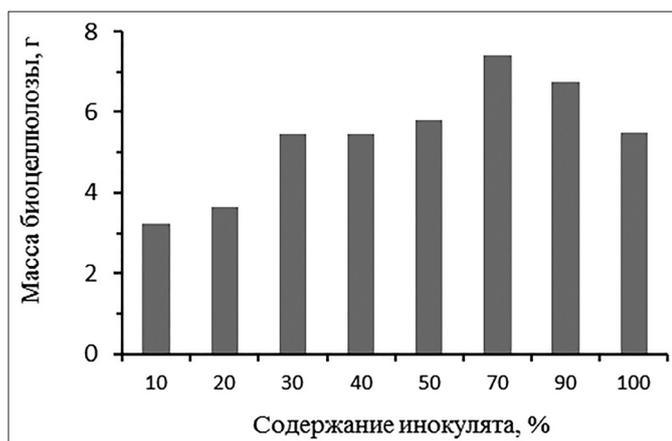


Рис. 3. Величины массы бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Medusomyces gisevii*, в зависимости от процентного содержания инокулята в питательной среде

Как видно из рисунков 4 и 5, в первые 5–8 суток наблюдается низкая продуктивность *Medusomyces gisevii*. В начальный период культивирования симбионта происходит активное формирование поверхностной гелевой пленки, представленной преимущественно полисахаридом целлюлозой. Поэтому в этот период органические кислоты синтезируются бактериями, находящимися в культуральной жидкости. На 8–10-е сутки в основном завершается формирование гелевой пленки, что проявляется в резком снижении величин рН и возрастании электропроводимости. Причем наиболее активная продуктивность микроорганизмов проявляется в условиях питательной среды, где в среде культивирования были экстракты кофе и зеленого чая. В случае использования в питательной среде экстракта

черного чая значения рН были несколько выше (рис. 4), а показатели электропроводимости — ниже (рис. 5).

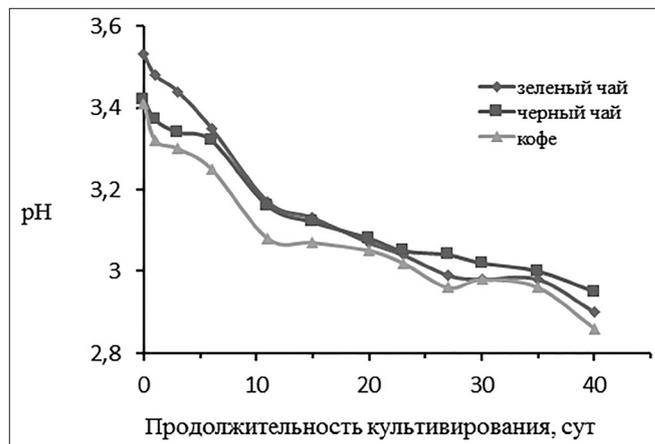


Рис. 4. Зависимость рН от времени культивирования *Medusomyces gisevii* в различных условиях питательной среды

Следует также отметить, что показатели рН и электропроводимости находятся в обратной (отрицательной) зависимости и в случае кофе и зеленого чая ($r = -0,95$), черного чая ($r = -0,99$) (табл. 3). Видно, что наиболее высокие значения коэффициента корреляции и критерия Стьюдента отмечаются между величинами рН и электропроводимости у экстрактов черного чая.

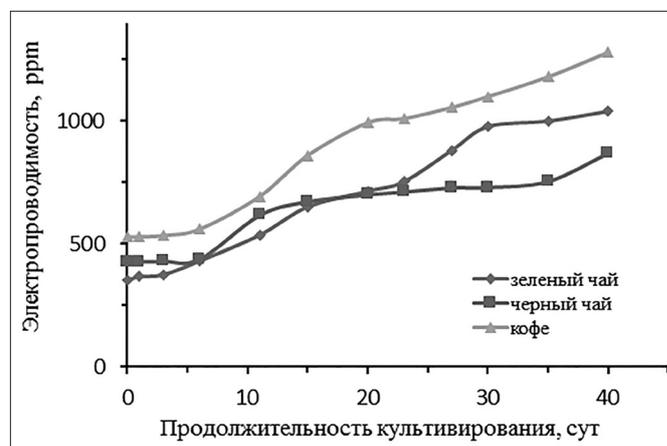


Рис. 5. Зависимость электропроводимости от времени культивирования *Medusomyces gisevii* в различных условиях питательной среды

Величины показателей корреляции свидетельствуют о том, что в процессе культивирования *Medusomyces gisevii* в культуральной среде накапливаются заряженные частицы, преимущественно карбоновые кислоты, возрастание которых проявляется в закислении среды, сопровождаемое понижением рН и увеличением электропроводимости.

**Данные корреляционного анализа рН и электропроводности для *Medusomyces gisevii*
в зависимости от условий питательной среды**

Параметры	Экстракты питательной среды		
	чай зеленый	чай черный	кофе
Коэффициент корреляции	-0,957	-0,987	-0,947
Статистическая ошибка коэффициента	0,0918	0,050	0,101
Критерий Стьюдента	10,42	19,53	9,36

Величины корреляции убедительно подтверждают возможность использования кондуктометрического метода в данном технологическом процессе. Подтверждением высказанных предположений служат результаты по динамике прироста величин электропроводности, представленные на рисунке 6.

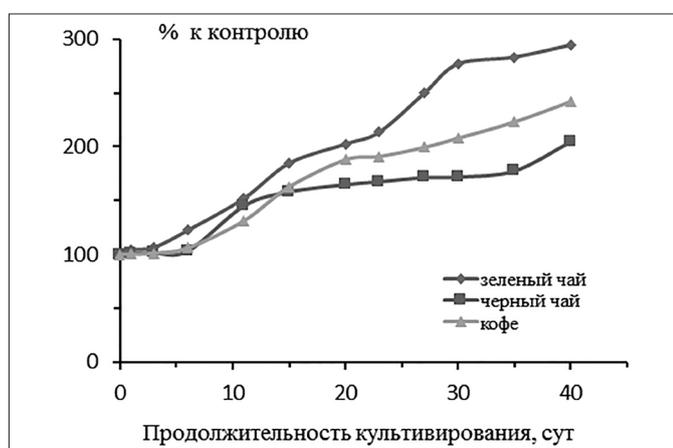


Рис. 6. Динамика процента к контролю величин электропроводности от времени культивирования *Medusomyces gisevii* в различных условиях питательной среды

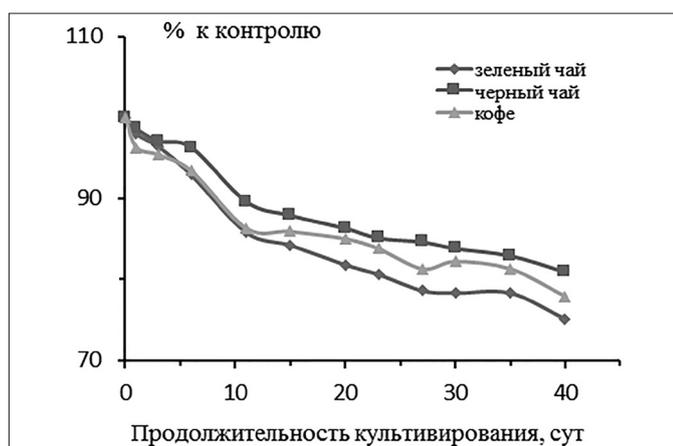


Рис. 7. Динамика процента к контролю величин рН от времени культивирования *Medusomyces gisevii* в различных условиях питательной среды

При этом следует отметить, что понижение величин рН в течение всего времени наблюдения для экстрак-

тов зеленого чая и кофе в культуральной среде составило 1,6, а для черного чая — 1,5 единиц рН (рис. 7). Тогда как диапазон прироста величин электропроводности культуральной среды мог варьировать в очень широком интервале от 450 до 750 ppm.

На рисунке 8 представлены величины массы биоцеллюлозы, синтезируемой *Medusomyces gisevii* в различных условиях среды на 40-е сутки культивирования. Видно, что наиболее оптимальные условия для продуцирования бактериальной целлюлозы предоставляет среда с черным чаем. В среде культивирования с зеленым чаем масса гель-пленки меньше в 2,6 раз, а в кофе — 3,8 раза.

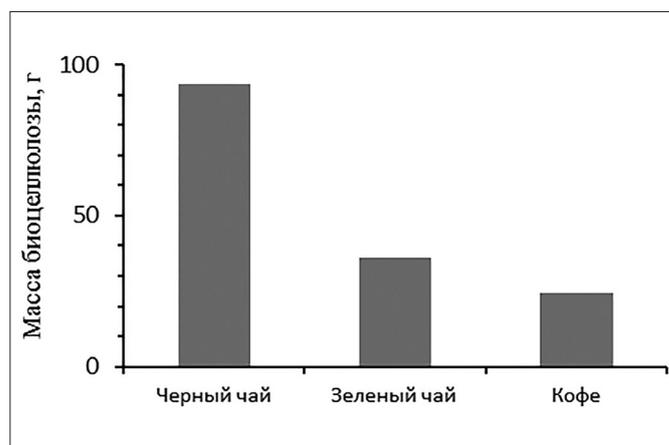


Рис. 8. Величины массы бактериальной целлюлозы, продуцируемой *Medusomyces gisevii*, в различных условиях питательной среды

Показатели массы гель-пленки свидетельствуют о том, что присутствие *Medusomyces gisevii* в среде с экстрактом кофе способствует проявлению высокой продуктивности микроорганизмами органических кислот, но низкой синтезирующей способности бактерий целлюлозы. Наличие в культуральной среде экстрактов чая черного способствует проявлению активности бактерий, синтезирующих биопленку, но при этом проявляется низкая активность бактерий, продуцирующих органические кислоты. В среде с экстрактом зеленого чая активно протекают оба этих процесса.

Заключение

В результате проведенных исследований было изучено влияние процентного состава инокулята на рост *Medusomyces gisevii* и бактериальной целлюлозы. Установлено, что во время культивирования симбионта происходит закисление среды, которое сопровождается понижением рН. При этом одновременно констатируется возрастание электропроводности культуральной жидкости. Согласно данным корреляционного анализа, установлена между величинами рН и электропроводности обратная (отрицательная) связь, свидетельствующая о том, что в культуральной среде преимущественно накапливаются карбоновые кислоты, концентрация которых проявляется в понижении рН и возрастании электропроводности. Поэтому нами впервые предложено для определения продуктивности *Medusomyces gisevii* в технологическом процессе, кроме потенциометрического метода, использовать кондуктометрический метод, который оказался прост в исполнении и очень чувствителен при проведении аналитических исследований по сравнению с традиционным рН-метрическим методом.

Литература

1. Асташкина А.П. Кондуктометрический метод контроля прироста микробной биомассы пробиотических микроорганизмов // Сибирский медицинский журнал. — 2011. — Т. 26. — № 2. — С. 75–77.
2. Гладышева Е.К. Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* J. Lindau на средах с различной начальной концентрацией глюкозы // Фундаментальные исследования. — 2015. — № 2. — С. 13–17.

3. Головинская О.В., Федорова Р.А. Хлеб функционального назначения с добавкой настоя чайного гриба // Хлебопечение России. — 2011. — № 6. — С. 22–23.
4. Даниелян Л.Т. Чайный гриб (Комбуча) и его биологические особенности. — М: Медицина, 2005. — 176 с.
5. Жумабекова К.А., Жумабекова Б.К. Получение высокоактивной ассоциации «чайного гриба» из природных штаммов микроорганизмов // Фундаментальные исследования. — 2015. — № 2. — С. 2374–2376.
6. Зайнуллин Р.А., Кунакова Р.В., Гаделева Х.К., Данилова О.А., Никитина А.А. Влияние условий культивирования чайного гриба (combucha) на его функциональные свойства в пищевых профилактических напитках // Известия вузов. Пищевая технология. — 2010. — № 4. — С. 29–31.
7. Ламберова А.А., Кошелев Ю.А., Ламберова М.Э. Исследование влияния состава питательной среды на эффективность роста и образования облепихового пищевого уксуса бактериями *Acetobacter aceti* // Ползуновский вестник. — 2008. — № 1–2. — С. 78–81.
8. Ляликов Ю.С. Физико-химические методы анализа. — М: Химия, 1974. — 536 с.
9. Неумывакин И.П. Чайный гриб. Чайный гриб — природный целитель. Мифы и реальность. — СПб: Диля, 2005. — 160 с.
10. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по биохимии сельскохозяйственной продукции. — СПб.: ГИОРД, 2016. — 480 с.
11. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. — СПб.: ГИОРД, 2004. — 240 с.
12. Юркевич Д.И., Кутышенко В.П. Медузомицет (чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма // Биофизика. — 2002. — Т. 47. — № 6. — С. 1116–1129.

EVALUATION OF THE PRODUCTIVITY OF *MEDUSOMYCES GISEVII* WITH THE VALUES OF pH AND ELECTRICAL CONDUCTIVITY

V.V. ROGOZHIN, Yu.V. ROGOZHIN

Yakutsk State Agricultural Academy, Yakutsk

The dynamics of pH and electrical conductivity of the culture liquid was studied and the mass of bacterial cellulose was determined. It was established that during the cultivation of the symbiont, the medium becomes acidified, which is accompanied by a decrease in pH. At the same time there is an increase in the electrical conductivity of the culture fluid. According to the correlation analysis, an inverse (negative) relationship was established between pH and electrical conductivity, indicating that carboxylic acids predominantly accumulate in the culture medium, the concentration of which is manifested in lowering the pH and increasing the electrical conductivity. In connection with this, for the first time we proposed to use the conductometric method to determine the productivity of *Medusomyces gisevii* in the technological process, in addition to the potentiometric method, which proved to be simple in execution and very sensitive in carrying out analytical studies in comparison with the traditional pH-metric method.

Keywords: conductometric method, electrical conductivity, microorganisms, bacteria, *Medusomyces gisevii*, bacterial cellulose, symbiosis.

НЕКОТОРЫЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГАЛОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ БИОТОПОВ ТЕРСКО-КУМСКОЙ НИЗМЕННОСТИ (РЕСПУБЛИКА ДАГЕСТАН)

Э.А. ХАЛИЛОВА*, Д.А. АЛИВЕРДИЕВА, С.Ц. КОТЕНКО

ФГБУН «Прикаспийский институт биологических ресурсов» ДНЦ РАН, Махачкала

Впервые проведены молекулярно-генетические исследования галофильных микроорганизмов, выделенных из засоленных почв и галофитов Терско-Кумской провинции Прикаспийской низменности (Республика Дагестан). По данным ПЦР, исследованные образцы бактерий принадлежат к представителям рода *Bacillus* и *Salimicrobium* филогенетической линии *Firmicutes* на уровне сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК 95%. Штаммы *Bacillus clausii*, *Salimicrobium halophilum*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* являются новыми видами, грамположительными, непатогенными, галофильными, амилазо-, протеазо- и каталазопродуцирующими. Изучение морфологических свойств дает возможность расширить список фенотипических показателей изолятов. Полученные данные представляют интерес для дальнейшей работы по изучению биоразнообразия и биотехнологической значимости галофильных микроорганизмов.

Ключевые слова: бактерии, 16S рРНК, ферменты, галофилы, микробиология.

Введение

Интерес к экстремофильным микроорганизмам в последние годы достаточно высок с точки зрения их биологической исключительности и высокого биотехнологического потенциала. Известны фундаментальные работы, посвященные генетическому разнообразию и структуре микробных сообществ гиперсоленых почв в различных географических зонах, особенностям их организации [6, 9]. Именно засоленность является главной экологической детерминантой, определяющей видовую структуру почвенных сообществ микроорганизмов. Подобные исследования являются актуальными и проводятся по Северному Кавказу впервые. Республика Дагестан представляет собой уникальную природную провинцию России и обладает многообразием природных ландшафтов благодаря влиянию тектонических процессов, эрозионной деятельности текучих вод и повторяющихся процессов трансгрессии и регрессии Каспийского моря. Северная часть природных экосистем Тарумовского района Прикаспийской низменности Республики Дагестан отнесена к Терско-Кумской аккумулятивно-, аллювиально-морской

хвалынской равнине с современными эоловыми формами рельефа и по природным особенностям близка к классическим образцам полупустынь. Возникновение засоленных территорий с признаками аридизации и опустынивания ландшафтов способствует возникновению условий для появления уникальных галофильных микроорганизмов, перспективных для использования в биотехнологии.

Целью исследований является выделение и исследование свойств экстремофильных микроорганизмов из природных объектов Терско-Кумской низменности.

Материалы и методы

Объектами исследований служили штаммы бактерий *Bacillus clausii*, *Salimicrobium halophilum*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, изолированные из солончаковых почв и галофита *Halostachys caspica* L. в северо-западной части Терско-Кумской провинции Прикаспийской низменности (Республика Дагестан) в июле 2017 года. Географические координаты региона исследований: северо-восточная граница — 44°46' с.ш., 47°10' в.д.; юго-восточная — 44°22' с.ш., 47°00' в.д. Температура наиболее холодного месяца минус — от -1,5 до -3,5 °С, наиболее теплого месяца — от +30 до +46 °С. По химизму засоления регион солончакового опустынивания был представлен гидрокарбонатно-натриевым составом солей.

Культивирование бактерий. Инкубирование микроорганизмов осуществляли в микробиологическом инкубаторе Binder-115 (США) при рабочей температуре

© 2017 г. Халилова Э.А., Аливердиева Д.А., Котенко С.Ц.

* Автор для переписки:

Халилова Эсланда Абдурахмановна

канд. биол. наук, лаборатория эколого-биохимических основ рационального использования биологических ресурсов, Прикаспийский институт биологических ресурсов, Махачкала

E-mail: eslanda61@mail.ru

30–37±1 °С в течение 7–20 дней. Для выделения галофильных бактерий использовали модифицированную среду [2, 3], представленную следующим составом (г/л): Vacto Yeast Extract – 10,00, Vacto-Pepton – 5,0, Na₃C₆H₅O₇×5,5 H₂O – 3,0, NaCl – 50, 100, 250, KCl – 2,0, MgSO₄×7 H₂O – 20,0, глицерин – 4,0. Для получения агаризованных сред использовали агар фирмы «Difco» (Испания); кислотность среды рН 7,2–7,4 контролировали с помощью рН-метра Hanna Instrumentals рН 211 (Германия).

Фенотипические свойства микроорганизмов (морфология клеток, подвижность, наличие спорообразования, культуральные признаки колоний), амилазную, каталазную и протеазную активность изучали с использованием стандартных методов [1]. Идентификацию выделенных штаммов проводили с помощью определителя Берджи [5]. Температурный диапазон роста и галотолерантность бактерий определяли по скорости роста колоний при температуре 30–37 °С и резистентности к NaCl (50, 100, 250 г/л среды).

Молекулярно-генетические исследования. Видовую идентификацию осуществляли сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с данными, размещенными в генбанке NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных CBS (cbs.knaw.nl). Выделение ДНК из образцов осуществляли модифицированным методом щелочного выделения ДНК Бирнбойма – Доли [4] и Wizard-технологии фирмы Promega (США). Секвенирование продуктов амплификации проводили (Центр «Биоинженерии» РАН, Москва) по методу Сэнгера с соавт. [8] на генетическом анализаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA). Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST [13]. Филогенетическое положение нового штамма *S. halophilum* определено Н.А. Черных (ИНМИ РАН, Москва).

Результаты и обсуждение

В работе были использованы бактерии, полученные методом накопительного культивирования с целью скрининга галофильных бактерий из природных образцов солончака и галофитов Прикаспийской низменности Республики Дагестан. В результате инкубации изолированных бактерий на элективных средах обнаружено более 20 колоний разнообразной микрофлоры, различающихся по культуральным и морфологическим признакам. С увеличением степени засоления в среде культивирования обнаружены радикальные изменения в окраске и форме

колоний. Для дальнейших морфо-физиологических и биохимических исследований отобраны 4 изолята, доминирующих в природных образцах и обуславливающих устойчивость к экстремальным факторам, характерным для прибрежных экосистем Прикаспийской низменности (табл. 1). Выделенные культуры являются грамположительными, факультативными анаэробами.

Для штаммов получены и секвенированы фрагменты генов 16S рРНК различной степени варибельности. По данным RDPClassifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier>), исследованные образцы принадлежат к представителям родов *Bacillus*, *Salimicrobium*, филогенетической линии *Firmicutes* (кlostридиальная линия грамположительных бактерий) на уровне сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК 95%.

Изолированные микроорганизмы являются новыми видами. Представители этих родов способны колонизировать в олиготрофных нишах, в солончаках типичных луговых, а также противостоять экологическому стрессу: дефициту влаги, высыханию, высоким температурам, химической дезинфекции. При большом разнообразии почвенных микроорганизмов олиготрофные бактерии *Bacillus* и *Salimicrobium* являются основными компонентами экстремофильных микробных сообществ засоленных почв. Примечательно, что изоляты бактерий являются мезофильными и умеренно галофильными микроорганизмами (табл. 2, 3). Как видно из таблицы 2, все выделенные штаммы демонстрировали устойчивый рост к 5–10% NaCl и температуре 30 и 37 °С.

В то же время, в отличие от других бактерий, отмечена резистентность к высокому содержанию соли (250 г/л NaCl) только у штамма *S. halophilum*. Для культуры *S. halophilum*, демонстрирующей достаточно высокие галофильные свойства, построено предварительное филогенетическое древо (рис. 1), где выделенный штамм занял положение нового вида. Для исследуемого образца определена практически полная последовательность (1274 нуклеотида) бактериального компонента амплификата гена, кодирующего 16S рРНК. По данным RDPClassifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier>), исследованный образец принадлежит к представителям рода *Salimicrobium* на уровне сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК 95%. Как следует из рисунка 1, представители этого рода грамположительные, галофильные, галотолерантные, факультативные анаэробы, обитающие в различных природных биотопах: соленое море, солончаковые почвы, а также выделенные из морских водорослей и соленых шкур животных (Китай,

Япония). Согласно существующим представлениям [10], этот уровень соответствует внутривидовому. При этом уровень сходства последовательностей изучаемого штам-

ма с представителями других видов рода *Salimicrobium* значительно низкая (25–50%), что подтверждает новизну изолированного штамма.

Таблица 1

Культуральные и морфологические признаки галофильных микроорганизмов, выделенных из природных биотопов Тарумовского района Прикаспийской низменности

Культуральные признаки			Морфологические признаки клеток из колоний активного роста
Среда с 50 г/л NaCl	Среда с 100 г/л NaCl	Среда с 250 г/л NaCl	
Образец № 1 (почва). Штамм <i>B. clausii</i>			
Колонии, выедающие агар, окруженные зонами преципитата, неправильной формы. Колонии имеют небольшую выпуклость, матовые, морщинистые, сухие в центре, край изрезанный, блестящий. Цвет палевый с серым оттенком, имеет воскообразный вид. Рост культуры хороший	Колонии неправильной формы, сухие, морщинистые, палевые с серым оттенком. Рост культуры слабый	Колонии неправильной формы, матовые, сухие, темно-палевого цвета. Встречаются отдельные колонии плоские, гладкие, блестящие. Выделенный штамм продуцирует розовато-коричневый пигмент. Рост культуры слабый	Палочковидные (0,9–1,5×3,0–5,0 мкм), спорогенные палочки с обрубленными концами, внешне напоминают восковые свечи. Эндоспоры расположены центрально, не превышают размер клетки, жгутики – перитрихально. Обладают подвижностью
Образец № 2 (почва). Штамм <i>S. halophilum</i>			
Роста культуры нет	Колонии неправильной формы, непрозрачные, сухие, морщинистые, палевые с серым оттенком. Рост культуры хороший.	Роста культуры нет	Палочковидные (0,5–1,0×2,5–9 мкм). Эндоспоры расположены центрально, не превышают размер клетки, эллипсоидные
Образец № 3 (почва). Штамм <i>B. pumilus</i>			
Колонии сухие, матовые, морщинистые, палевые с серым оттенком, края кружевные, к центру сморщенные. Рост культуры слабый	Колонии сухие, морщинистые, палевые с серым оттенком и «восковидные», серо-белые распластанные с неровными волнистыми краями. Рост культуры хороший.	Колонии неровные, плоские, матовые, сухие, коричневого цвета. Цвет оранжевый и ярко-терракотовый. Рост культуры слабый	Палочковидные 1,0 мкм
Образец № 4-(растение). Штамм <i>B. licheniformis</i>			
Колония неправильной формы, поверхность шероховатая, морщинистая; профиль плоский, врастающий в субстрат; край изрезанный, складчатый. Цвет – бело-желтый, местами с розовинкой. Рост культуры хороший	Колонии, выедающие агар, морщинистые, палевого цвета с более выраженным розовым оттенком. Рост культуры слабый	Колонии единичные, мелкие, матовые, сухие, темно-палевого цвета. Редкие колонии бледно-оранжевого цвета. Рост культуры слабый	Палочковидные, подвижные. (0,4×1,6 мкм). Образуют эндоспоры. Спорообразование в основном центральное, споры не расширяют материнскую клетку

Рост штаммов бактерий в присутствии разных концентраций NaCl

Культура бактерии	Рост микроорганизмов при концентрации NaCl (Т 30 °С)								
	03.07.17			07.07.17			10.07.17		
	50 г/л	100 г/л	250 г/л	50 г/л	100 г/л	250 г/л	50 г/л	100 г/л	250 г/л
<i>B. clausii</i>	++	++	-	++	+	-	++	++	-
<i>S. halophilum</i>	++	+	+	+	+	+	++	++	++
<i>B. pumilus</i>	++	++	+	++	+	+	++	++	+
<i>B. licheniformis</i>	++	++	-	++	++	-	++	++	-

Примечание: «++» – интенсивный рост, «+» – хороший рост, «+-» – средний рост, «-» – отсутствие роста

Температурный диапазон роста изолятов бактерий

Культура бактерии	Рост бактерий при температуре					
	30 °С			37 °С		
	50 г/л	100 г/л	250 г/л	50 г/л	100 г/л	250 г/л
<i>B. clausii</i>	++	++	-	+	+	-
<i>S. halophilum</i>	++	++	++	+	+	++
<i>B. pumilus</i>	++	++	+	+	+	+
<i>B. licheniformis</i>	++	++	-	+	-	-

Примечание: штаммы выращивали на селективной среде в пробирках и чашках Петри в стационарных условиях. «+» – рост в виде тонкой, рыхлой, гладкой пленки; «++» – рост в виде плотной, складчатой пленки; «-» – рост отсутствует

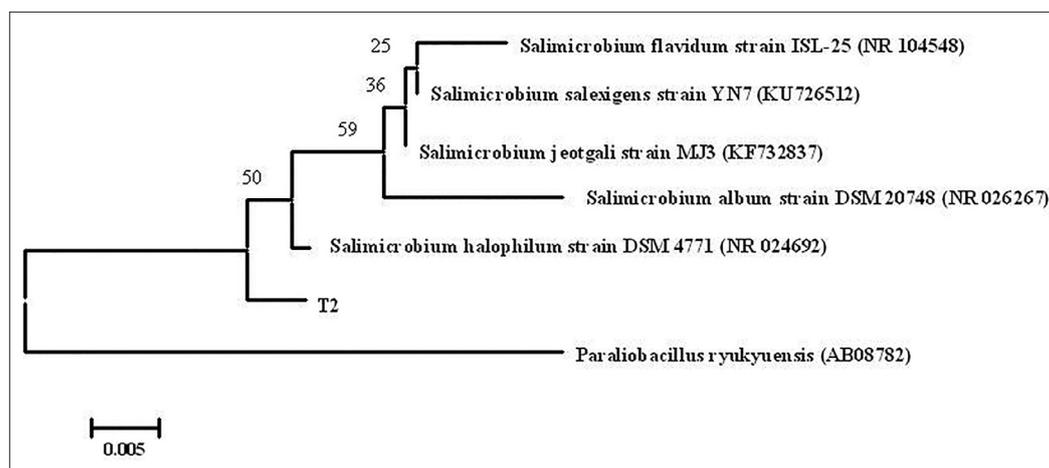


Рис. 1. Филогенетическое положение *S. halophilum*. Исследуемый штамм отмечен обозначением символом T2. Эволюция филогенетического дерева составлена с использованием метода максимального правдоподобия на основе модели Tamura – Nei [11]. Показано дерево с высоким логарифмическим подобием (-2302.8140). Таксоны сгруппированы вместе с отображенными ветвями деревьев с указанием процента приближения. Исходное дерево для эвристического поиска было получено автоматическим путем с применением Neighbor-Join и BioNJ алгоритмов к матрице попарных расстояний и оценивалось с использованием подхода максимального правдоподобия Composite (MCL), выбором топологии с превосходным значением логарифмического правдоподобия. В анализе участвовало 7 нуклеотидных последовательностей. Все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, устранены. В конечном наборе данных в общей сложности присутствовало 1214 позиций. Эволюционные анализы были проведены в MEGA6 [12]

Основным признаком *B. pumilus* является способность активно восстанавливать сульфат до каталазы, амилазы, протеазы (табл. 4) и синтезировать ряд других биологически активных веществ [14], способствующих сохранению биохимического потенциала аридных экосистем. Кроме того, *B. pumilus* участвует в широком диапазоне симбиотических отношений и функционирует в качестве фактора роста растений в засоленных почвах [5].

В большинстве случаев штаммы *B. clausii* обнаруживаются как составляющие микрофлоры почвы, а некоторые их свойства могут использоваться в производстве щелочной протеазы, амилазы и каталазы (см. табл. 4). Известны антагонистические свойства отдельных штаммов *B. clausii* по отношению к другим видам бактерий; они способны синтезировать антибиотики, необходимые для защиты растений от патогенных микроорганизмов в острозасушливых климатических условиях. *B. clausii* наряду с прочими спорообразующими бактериями является важным для человека пробиотиком [7].

Штамм *B. licheniformis*, являясь сапрофитом, выполняет функции компонента дезинфекции почвы, используется в составе сельскохозяйственных удобрений. Особенности роста *B. licheniformis* на мясопептонном бульоне подтверждаются: характерной плотной, складчатой пленкой с пигментацией на поверхности; своеобразным бактериальным запахом; помутнение среды и выделение газа отсутствуют [5].

Таблица 4

Каталазная, амилазная и протеазная активность бактериальных культур

Культура	Каталазная активность	Амилазная активность	Протеазная активность
<i>B. clausii</i>	+	+	+
<i>B. licheniformis</i>	-	+	-
<i>S. halophilum</i>	-	+	-
<i>B. pumilus</i>	+	+	+

Примечание: "+" — положительно, "-" — отрицательно

Таким образом, как видно из таблицы 4, штаммы *B. clausii* и *B. pumilus* демонстрировали высокую способность продуцировать каталазу, протеазу и амилазу. Причем, *B. licheniformis* и *S. halophilum* способны продуцировать только амилазу.

Нами была изучена восприимчивость галофильных бактерий рода *Bacillus* и *Salimicrobium* к антибиотикам (табл. 5). По ряду патогенности штаммы можно расположить следующим образом: *B. licheniformis*, *B. clausii*, *S. halophilum*, *B. pumilus*.

Восприимчивость положительная. Все изолированные грамположительные бактерии восприимчивы к антибиотикам широкого антимикробного спектра — фторхинолонов 1- и 2-го поколения (триметоприм, ципрофлоксацин, офлоксацин, канамицин). Это относится и к ванкомицину из макролидной группы, активным в отношении грамположительных микроорганизмов, прежде всего кокковой группы.

Восприимчивость средняя. Штаммы *B. clausii* — восприимчивы к классическим видам антибиотиков цефуроксима (цефалоспорины 2-го поколения) и клотримазола (группа производных имидазола); *B. licheniformis* — восприимчивы к клотримазола (группа производных имидазола); *S. halophilum* — восприимчивы к цефаклору (цефалоспорины 2-го поколения).

Восприимчивость отрицательная. *B. clausii* — восприимчивы к антибиотикам 3-го поколения цефалоспоринов: цефтазидима, фосфомицина, кларитромицину (группа макролидов); *B. licheniformis* — восприимчивы к цефтазидиму (цефалоспорины 3-го поколения), фосфомицину (группа пенициллинов), цефепиму и цефаклору (цефалоспорины 4-го поколения), кларитромицину (группа макролидов); *S. halophilum* — восприимчивы к антибиотикам цефепим (цефалоспорины 3-го поколения) и клоритримазол (из группы производных имидазола); *B. pumilus* — восприимчивы к ампицилину, клоритримазолу. На основании полученных результатов можно заключить, что бактерии непатогенны и восприимчивы к достаточно большому перечню антибиотиков групп фторхинолонов, цефалоспоринов и макролидов.

Таблица 5

Восприимчивость галофильных бактерий рода *Bacillus* и *Salimicrobium* к антибиотикам

Антибиотик	Культуры бактерий			
	<i>B. clausii</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>S. halophilum</i>	<i>B. pumilus</i>
Ампицилин	+	+	+	-
Триметоприм	+	+	+	+
Ципрофлоксацин	+	+	+	+
Цефтазидим	-	-	+	+
Фосфомицин	-	-	+	+

Цефуроксим	+/-	+	+	+
Цефепим	+	-	-	+
Цефаклор	+	-	+/-	+
Офлоксацин	+	+	+	+
Ванкомицин	+	+	+	+
Канамицин	+	+	+	+
Кларитромицин	-	-	+	+
Рифампицин	+	+	+	+
Клотримазол	+/-	+/-	-	-

Примечание: «+» — положительно, «-» — отрицательно

Заключение

Впервые проведены молекулярно-генетические исследования галофильных микробных сообществ, выделенных из засоленных почв и галофитов Терско-Кумской провинции Прикаспийской низменности. Бактерии принадлежат к представителям новых видов родов *Bacillus* и *Salimicrobium* с достоверностью 95%. Согласно данным BLAST-анализа, ближайшими по сходству были штаммы *B. clausii*, *S. halophilum*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*. Изолированные штаммы являются грамположительными, непатогенными, галофильными, обладают амилазной, протеазной и каталазной активностью. При большом разнообразии почвенных микроорганизмов бактерии родов *Bacillus* и *Salimicrobium* являются основными компонентами гетеротрофных умеренно галофильных бактериальных сообществ засоленных почв Терско-Кумской провинции. Полученные данные представляют интерес для дальнейшей работы по изучению биоразнообразия и биотехнологической значимости новых изолятов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН 1.21. «Биологическое разнообразие природных систем. Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга».

Литература

1. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений (ред. Нетрусов А.И.). — М.: Академия. — 2005. — 608 с.
2. Способ получения биомассы галобактерий: пат. 2115722 С2 Рос. Федерация: МПК С12N1/20 Лалов В.В., Осокина Н.В., Пиорунский Д.А., Чижиков М.А. заявитель

и патентообладатель Акционерное общество открытого типа «Никос рисеч Корпорейшн», Открытое акционерное общество «Аксон» (RU) — № 95122190/13; — заявл. 29.12.95; — опубл. 20.07.1998.

3. Способ получения биомассы галобактерий: пат. 2323226 С2 Рос. Федерация: МПК С07К14/215, С12N1/20, С12P13/00, С12R1/01 (2006.01) Кузнецов А.Е., Каленов С.В. заявитель и патентообладатель Кузнецов А.Е., Каленов С.В. (RU) — № 2006118729/13, — заявл. 30.05.06; — опубл. 27.04.08.
4. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Res.* — 1979. — Vol. 7. — No. 6. — P. 1513–1523.
5. Holt J.G., Krig N.R., Peter H.A., Staley S.J., Williams S.T. *Bergey's Manual of Determinative.* — М.: Mir. — 1997. — Т. 2. — 368 p.
6. Johnson R.M., Ramond J.B., Gunnigle E., Seely M., Cowan D.A. Namib Desert edaphic bacterial, fungal and archaeal communities assemble through deterministic processes but are influenced by different abiotic parameters // *Extremophiles.* — 2017. — Vol. 21(2). — P. 381–392.
7. Rath K.M., Rousk J. Salt effects on the soil microbial decomposer community and their role in organic carbon cycling: A review // *Soil Biology and Biochemistry.* — 2014. — Vol. 81. — P. 108–123.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad.* — 1977. — Sci. USA. — Vol. 84. — P. 5463–5467.
9. Selvarajan R., Sibanda T., Tekere M., Nyoni H., Meddows-Taylor S. Diversity Analysis and Bioresource Characterization of Halophilic Bacteria Isolated from a South African Saltpan // *Molecules.* — 2017. — Vol. 22(4). — P. 657–677.
10. Stackebrandt E., Goebel B.M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1994. — Vol. 44. — No. 4. — P. 846–849.
11. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution.* — 1993. — Vol. 10. — P. 512–526.
12. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution.* — 2013. — Vol. 30. — P. 2725–2729.
13. Van de Peer Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // *Comput. Applic. Biosci.* — 1994. — Vol. 10. — P. 569–570.
14. Yuan Y., Gao M. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy // *Scientific Reports.* — 2015. — Vol. 5. — P. 10259–10268.

**SOME PHENOTYPIC FEATURES OF HALOPHILIC MICROORGANISMS
FROM NATURAL HABITATS OF THE TEREK-KUMA LOWLAND
(REPUBLIC OF DAGESTAN)**

E.A. KHALILOVA, D.A. ALIVERDIYEVA, S.C. KOTENKO

Pre-Caspian Institute of Biological Resources, Dagestan Scientific Center of RAS, Makhachkala

Molecular genetic studies of halophilic microorganisms isolated from saline soils and halophytes of the Terek-Kuma province of the Caspian lowland (Republic of Dagestan) were conducted for the first time. According to PCR, the bacterial samples studied belong to the representatives of the genus *Bacillus* and *Salimicrobium* of the phylogenetic line *Firmicutes* at the level of similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA genes of 95%. Strains *Bacillus clausii*, *Salimicrobium halophilum*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* are new species, Gram-positive, non-pathogenic, halophilic, amylase, protease and catalase-producing. The study of morphological properties makes it possible to expand the list of phenotypic parameters of isolates. The data obtained are of interest for further work on the study of biodiversity and the biotechnological significance of halophilic microorganisms.

Keywords: bacteria, 16S rRNA, enzymes, halophiles, microbiology.

ВЛИЯНИЕ НЕФТИ КАК НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ФАКТОРА НА РАСТЕНИЯ И ФИТОРЕМЕДИАЦИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

А.Ю. СТЕПАНОВА*, А.И. СОЛОВЬЕВА, Е.А. ГЛАДКОВ

ФГБУН «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН», Москва

Рассмотрено влияние нефти как неблагоприятного экологического фактора на различные виды растений. Несмотря на то, что нефть обладает высоким уровнем токсичности для большинства растений, существуют виды не только устойчивые к нефти, но и способные к ее утилизации. Перечислены растения, обладающие фиторемедиационными свойствами. Охарактеризованы механизмы фиторемедиации нефтезагрязненных территорий, основным из них является ризодеградация, при которой растения создают условия для развития нефтеокисляющих бактерий.

Ключевые слова: нефть, растения, фиторемедиация, ризодеградация.

Загрязнение нефтью почвы является одним из наиболее значимых неблагоприятных антропогенных экологических факторов, оказывающих негативное воздействие на экосистему. В результате загрязнения происходит уменьшение содержания элементов минерального питания вследствие: отрицательного влияния нефти на микроорганизмы, участвующие в круговороте этих элементов (Хазиев, 1988 [17]; Шаркова, 2011 [20]); увеличения численности микромицетов, продуцирующих токсины, отрицательно воздействующие на биологические объекты (Назаров, 2007 [14]; Киреева, 2000 [8]); уменьшения содержания кислорода, что приводит к развитию почвенной гипоксии (Rowell, 1977) [48].

Согласно литературным данным, основными факторами отрицательного воздействия нефти на биологические объекты являются прямое токсическое действие углеводородов нефти и изменение физико-химических свойств почвы (Халимов и др., 1996 [19]; Киреева и др., 2001 [9]; Назаров, 2007 [14]; Халилова, 2012 [18]). В ряде работ показано, что рост гидрофобности и другие физико-химические изменения почвы обусловлены тяжелыми фракциями нефти, а прямой токсический эффект — легкими фракциями (Халимов и др., 1996 [19]; Дедков и др., 1997 [4]; Salanitro et al., 1997 [49]). Несмотря на то, что загрязнение легкой нефтью оказывает более

сильное, по сравнению с тяжелой нефтью, воздействие на растительные объекты (Salanitro et al., 1997) [49], легкие фракции быстро разрушаются с помощью микроорганизмов-деструкторов нефти или мигрируют из почвы. Следовательно, при сильном загрязнении основное негативное влияние на биологические объекты оказывают именно тяжелые фракции (Халимов и др., 1996 [19]; Халилова, 2012 [18]; Das, Chandran, 2011 [29]).

В настоящее время в России нет единого представления о безопасном содержании в почве нефти, и поэтому ПДК для нефтепродуктов в почве не установлены (Крятов и др., 2012) [11]. Только для отдельных продуктов нефтепереработки ПДК представлены в гигиенических нормативах ГН 2.1.7.2041–06, утвержденных 1 апреля 2006 г. В зарубежных странах, например, Германии и Голландии, принято считать фоновым уровнем содержание нефтепродуктов около 50 мг/кг в почве; повышенным загрязнением, при котором организмы мониторят, выявляют и ликвидируют причины загрязнения — 1000 мг/кг; серьезным экологическим ущербом, при котором необходима рекультивация — 5000 мг/кг и более (Васильченко, Воеводина, 2015) [2].

Влияние нефти на растения

В настоящее время опубликовано значительное число работ, посвященных воздействию нефти на растения. Для оценки чувствительности растений к нефти обычно используют следующие показатели: всхожесть, рост и продуктивность, физиолого-биохимические параметры. Кроме того, некоторые авторы считают, что более инфор-

© 2017 г. Степанова А.Ю., Соловьева А.И., Гладков Е.А.

* **Автор для переписки:**

Степанова Анна Юрьевна,
кандидат биол.наук, руководитель группы специализированного метаболизма корней отдела биологии клетки и биотехнологии,
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
E-mail: step_ann@mail.ru

мативными для оценки состояния растений при действии неблагоприятных факторов, в том числе и нефти, являются показатели фотосинтеза, дыхания и параметры, характеризующие окислительный стресс (Маслова, Табаленкова, 2010 [12]; Ujowundu et al., 2011 [54]).

Загрязнение почвы нефтью в большинстве случаев негативно влияет на всхожесть семян: при концентрациях сырой нефти в почве 0,2–2,8% снижение всхожести растений составляло от 10 до 40%, при содержании 3–7% — от 15 до 89%, а при 7% нефти — от 73% до полной гибели семян (Халилова, 2012) [18]. К наиболее чувствительным видам, всхожесть которых значительно снижалась при концентрации нефти меньше 3%, относят: редис (*Raphanus sativus* L. ssp. *radicula* (Pers.)), кресс-салат (*Lepidium sativum* L.), салат (*Lactuca sativa* L.), пшеницу (*Triticum aestivum* L.) (Халилова, 2012 [18]; Смольникова, 2009). С другой стороны, существуют растения, сохраняющие высокую всхожесть и при 4–7% нефти в почве, — это пырей (*Agropyron smithi* L.), подсолнечник (*Helianthus annuus* L.), сафлора (*Carthamus tinctorius* L.) и клевер (*Trifolium repens* L.) (Besalatpour et al., 2008) [25].

Однако некоторые данные по всхожести семян противоречивы. Например, одними авторами (Демиденко и др., 1983) [5] показана максимальная концентрация нефти, при которой наблюдалось полное торможение прорастания семян овса (*Avena sativa* L.) — 10%, другими — 5% (Петухов и др., 2000) [15]. Возможным объяснением может быть многокомпонентный состав нефти, а также повышение токсичности почвы в результате деятельности микомицетов (Мирчинк, 1988) [13]. В оригинальных экспериментах Назарова показана разная чувствительность семян клевера лугового (*Trifolium pretense* L.) к нефти в зависимости от различий в постановке эксперимента. Автором было сделано заключение, что всхожесть не может являться универсальным показателем оценки токсичности поллютанта (Назаров, 2007) [14].

В ряде работ показано, что низкие концентрации нефти оказывали и стимулирующий эффект на следующие виды: кукурузу (*Zea mays* L.), овес (*Avena sativa* L.), пшеницу (*Triticum aestivum* L.), ель, сосну, лиственницу (Salanitro et al., 1997 [49]; Седых, Игнатъев, 2002 [16]; Донец, Григорьев, 2008 [6]). Одним из объяснений может служить наличие в нефти органических и растворенных минеральных веществ, положительно влияющих на прорастание.

Другие авторы используют в качестве основного критерия устойчивости изменения роста и биомассы. В литературе для изучения влияния нефти на растения, в

основном, используют концентрации от 0,5–1,5%, поскольку, начиная с этих значений, возникает быстрый видимый ответ у большинства растений, как правило, связанный с торможением роста корней и побегов, снижением биомассы и продуктивности, ингибированием физиологических процессов (Седых, Игнатъев, 2002 [16]; Бородулина, Полонский, 2010 [1]; Masakorala, 2013 [44]; Shahsavari, 2013 [51]; Маслова и др., 2010 [12]). Однако в других работах при этих же концентрациях наблюдали стимулирующее действие присутствия нефти (Киреева и др., 2006 [10]; Shahsavari, 2013 [51]).

Возможными причинами могут быть различия в постановке эксперимента, состав нефти и почвы, сортовые особенности растений, продолжительность проведения эксперимента. Например, в работе Киреевой и Водопьянова (2007), показано, что при 1% нефти в почве через 30 суток биомасса побегов люцерны не отличалась от контроля, через 60 суток уменьшалась в 7 раз и в дальнейшем роста биомассы не наблюдалось [7]. Устойчивость растений также зависит от стадии развития: наиболее чувствительны к токсическому воздействию растения, находящиеся на ранних стадиях развития, а устойчивы — многолетние, взрослые растения, поскольку после гибели побегов в результате загрязнения происходит их восстановление из спящих почек (Masakorala, 2013) [44]. Для некоторых растений ингибирование проявляется при содержании нефти в почве в более высоких концентрациях. Например, крестовник, *Senecio glaucus*, растущий в пустыне Кувейта, устойчив к загрязнению почвы нефтью до 10% (Radwan et al., 1995) [46].

В условиях нефтезагрязнений у растений могут возникать изменения на анатомическом уровне, связанные с появлением гигантских или, наоборот, карликовых форм, возникновением наростов, наплывов, утолщений, придающих растениям неестественный облик; на физиологическом уровне — нарушением нормального ритма развития растений (Грищенко, 1982) [3]. На клеточном уровне изменения отражаются на работе фотосинтетического аппарата, митохондрий. В результате действия нефти повышается содержание стресс-протекторов — антоцианов, аскорбиновой кислоты, рибофлавина, наблюдается усиление окислительного стресса (Маслова, Табаленкова, 2010) [12]. Тем не менее существуют растения, устойчивые к нефтезагрязнениям. Если при выращивании таких растений наблюдается снижение нефти в почве, то их можно рекомендовать для фиторемедиации.

Frick et al. (1999) [34] приводят следующий список растений, обладающих фиторемедиационным потенциалом:

- *Agropyron smithii*;
- *Andropogon gerardii*;
- *Bouteloua curtipendula*;
- *Bouteloua gracilis*;
- *Buchloe dactyloides*;
- *Buchloe dactyloides* var. *Prairie*;
- *Chloris gayana*;
- *Cynodon dactylon* L.;
- *Daucus carota*;
- *Elymus canadensis*;
- *Festuca arundinacea* Schreb.;
- *Festuca rubra* var. *Arctared*;
- *Glycine max*;
- *Lemna gibba*;
- *Lolium multiflorum*;
- *Lolium perenne* L.;
- *Medicago sativa* L.;
- *Panicum coloratum* var. *Verde*;
- *Panicum virgatum*;
- *Panicum vulgare* L.;
- *Populus deltoides* x *nigra*;
- *Schizachyrium scoparium*;
- *Secale cereale* L.;
- *Sorghastrum nutans*;
- *Sorghum vulgare* L.;
- *Sorghum vulgare* L.;
- *Zoysia japonica* var. *Meyer*.

Фиторемедиация

Под фиторемедиацией понимают использование растений для накопления, удаления, разрушения органических или неорганических загрязнителей из почвы, поверхностных и подземных вод (Tsao, 2001) [53].

Концепция фиторемедиации зародилась в 1980 году, и она была связана со способностью некоторых видов растений накапливать в органах и тканях ионы тяжелых металлов в достаточно больших количествах (Baker et al., 1988) [24]. В дальнейшем растения с такими свойствами начали целенаправленно использовать для практических целей, что в конечном итоге привело к возникновению нового направления — фиторемедиации (термин стал использоваться в литературе с 1993 г.) и новой технологии — фитотехнологии (Cunningham, Berti, 1995 [27]; Raskin et al., 1997 [47]; Salt et al., 1995 [50]).

Большая часть ранних исследований по фиторемедиации сосредоточена на очистке водных объектов и почвы от тяжелых металлов (Gladkov et al., 2016) [36],

однако в 1990-х годах появились данные по фиторемедиации территорий от органических загрязнителей, в большей степени, от пестицидов и гербицидов (Anderson et al., 1993 [22]; Sicilano, Germida, 1998 [52]; Blaylock et al., 1997; Duxbury, 2002).

В это же время появляются работы и по фиторемедиации от углеводов нефти, но они немногочисленны (Aprill, Sims, 1990) [23]. Интерес к фиторемедиации нефтяных углеводов как широко распространенных и трудно утилизируемых загрязнителей возрос за последнее десятилетие в связи с увеличением темпа роста нефтяной промышленности. В частности, изучается применение фиторемедиации для очистки почвы от полициклических ароматических углеводов (ПАУ), алифатических загрязнителей и других углеводов (Frick et al., 1999 [34]; Hutchinson et al., 2001; Arthur et al., 2005).

Интерес к фиторемедиации отчасти обусловлен ее низкой стоимостью. Например, на фиторемедиацию в США тратится 100–150 млн. долларов в год, что составляет 0,5% всех затрат на очистку окружающей среды (для сравнения — затраты на биоремедиацию с использованием бактерий составляют 2%). Фиторемедиация не требует экскавации почвы и может применяться на больших площадях, что особенно важно для отечественной нефтяной промышленности (Frick et al., 1999 [34]; Macek et al., 2000 [43]; Glick, 2003 [37]), не оказывает вредного воздействия на окружающую среду, не требует каких-либо специальных дополнительных пространств, техники.

Фиторемедиация способствует сохранению и улучшению окружающей среды, так как связана с выращиванием растений, а, следовательно, улучшением состоянием почв и защитой их от эрозии. Это — наиболее эстетичная технология очистки почвы, что тоже немаловажно. Тем не менее эта технология имеет ряд особенностей. Успешность фиторемедиации зависит и от состава загрязнителя, и от вида растений, используемых для этих целей. Доступность поллютанта для растения определяется его химическими свойствами, физико-химическими свойствами почвы, глубиной залегания, скоростью его разложения до обычных метаболитов в клетках растения (Cunningham, Ow, 1996) [28]. Растения, в свою очередь, должны быть устойчивыми к загрязнителю, обладать механизмами, способствующими успешной фиторемедиации (см. ниже), иметь хорошо развитую корневую систему (важна глубина проникновения корня) и хорошо быть адаптированными к климатическим условиям (Gaskin, Soole, Bentham, 2008) [35].

Фиторемедиация нефтезагрязненных почв

Нефть является сложной многокомпонентной системой, основу которой составляют углеводороды: алифатические (алканы, алкены, алкины, циклоалканы) и ароматические (моноароматические и полициклические ароматические углеводороды). Основными механизмами для фиторемедиации нефтезагрязненных территорий являются фито- и ризодеградация, фитоволатилизация.

Под ризодеградацией понимают процесс ремедиации загрязненных территорий с помощью микроорганизмов, активность которых инициирована растениями (табл. 2). Исследования по ризодеградации включают в себя, в первую очередь, изучение растительно-микробных

ассоциаций и механизмов взаимодействия растений и микроорганизмов (Lin et al., 2008 [42]; Philips et al., 2009 [45]; Yavari, Malakahmad, Sapari, 2015 [55]). При изучении растительно-микробной ассоциации большинство исследователей склоняется к тому, что основную роль в деградации нефти выполняют микроорганизмы, в то время как растения стимулируют их рост и улучшают состояние почвы (Khan et al., 2013 [38]; Yavari, Malakahmad, Sapari, 2015 [55]). Воздействие растений на микроорганизмы происходит через корневую систему, в первую очередь, через корневые экссудаты, содержащие органические вещества, которые могут поддерживать метаболизм микроорганизмов (например, сахара, аминокислоты) (Knee et al., 2001) [40] и облегчать утилизацию загрязнителя.

Таблица 2

Растения, используемые для фиторемедиации нефтезагрязненных территорий

Виды растений	Загрязнитель	Механизм
<i>Vicia faba</i>	углеводороды нефти (сырая нефть)	ризодеградация
<i>Cynodon dactylon</i>	углеводороды нефти	ризодеградация
<i>Andropogon gerardi</i>	полициклические ароматические углеводороды	ризодеградация
<i>Salix spp.</i>	дизель (алканы C ₁₀ –C ₃₆)	ризодеградация
<i>Salix Populus spp.</i>	дизель	ризодеградация
<i>Trifolium sp.</i>	углеводороды нефти, пирен; полициклические ароматические углеводороды	ризодеградация
<i>Zea mays</i>	сырая нефть, алифатические углеводороды	ризодеградация
<i>Medicago sativa</i>	углеводороды нефти, бензопирен, полициклические ароматические углеводороды	ризодеградация
<i>Avena sativa</i>	пирен	ризодеградация
<i>Festuca arundinacea</i>	полициклические ароматические углеводороды; углеводороды нефти; пирен; фенантрен	ризодеградация
	пирен	ризодеградация, фитоэкстракция
<i>Festuca rubra</i>	углеводороды нефти	ризодеградация
<i>Panicum virgatum</i>	полициклические ароматические углеводороды	ризодеградация
<i>Triticum aestivum</i>	сырая нефть, алифатические углеводороды	ризодеградация
<i>Agropyron smithii</i>	полициклические ароматические углеводороды	ризодеградация
<i>Lolium perenne</i>	углеводороды нефти, фенантрен	ризодеградация
<i>Lolium multiflorum</i>	полициклические ароматические углеводороды	ризодеградация
<i>Oryza sativa</i>	полициклические ароматические углеводороды	ризодеградация
<i>Secale cereale</i>	пирен	ризодеградация
<i>Pinus sylvestris</i>	углеводороды нефти	ризодеградация
<i>Sorghum bicolor</i>	нефть	ризодеградация
<i>Sorghum vulgare</i>	ризодеградация	пирен
<i>Glycine maxima</i>	нефть	ризодеградация

Корни растений могут рыхлить и выделять кислород в почву, стимулируя энергетический метаболизм микроорганизмов и увеличивая численность аэробов (Kuiper et al, 2004) [41]. Выделя органические кислоты, растения могут повышать доступность гидрофобных соединений (Masek et al., 2000) [43]. При этом наблюдается специфичность растений по отношению к разным органическим загрязнителям. Например, при изучении способности к утилизации ПАУ дизеля было показано, что люцерна лучше утилизирует ПАУ, чем райграс, который, в свою очередь, способствует лучшей деградации дизеля по сравнению с люцерной (Kirk et al., 2005) [39].

Тем не менее в литературе встречаются работы, согласно которым растения не влияли на утилизацию нефтепродуктов в почве. Например, в работе Ферро с соавторами было выявлено, что выращивание житняка пустынного (*Agropyron desertorum*) совершенно не влияло на скорость минерализации [¹⁴C]фенантарена (Ferro et al., 1994) [32]. Авторы объясняют данный факт быстрой минерализацией фенантрена микробами до установления взаимодействия между микробами и корнями растений. Этими же исследователями позже было установлено, что присутствие люцерны не влияет на скорости утилизации бензола (Ferro et al., 1997) [33]. Однако они отмечают, что содержание поллютанта было небольшим, и он также быстро утилизировался микробами.

Другим механизмом фиторемедиации почвы от нефти и продуктов ее переработки является фитодеградация, под которой понимают разрушение органических поллютантов растениями и их метаболизацию. Однако работы в этом направлении единичные (Durshimidze et al., 1977 [31]; Chrikishvili et al., 2006 [26]) и перспективность этого метода для фиторемедиации нефтезагрязненных территорий в литературе обсуждается (Alkorta et al., 2001 [21]). В целях улучшения фитодеградации используют методы генетической инженерии. Так, в работе Доти с соавторами были получены трансгенные растения тополя (*Populus tremula* × *P. alba*) с встроенным геном *CYP2E1*, кодирующим цитохром P450 2E1, которые более эффективно метаболизировали трихлорэтилен, хлороформ и бензол из воздуха по сравнению с контролем (Doty et al., 2007) [30].

Таким образом, в настоящем обзоре рассмотрено влияние нефти как антропогенного фактора на рост и развитие растений, а также перспективы и возможности применения растений для очистки почвы от нефтезагрязнений.

Литература

1. Бородулина Т.С., Полонский В.И. Влияние нефтезагрязнения почвы на физиологические характеристики растений пшеницы // Вестник КрасГАУ. — 2010. — Т. 5. — С. 50–55.
2. Васильченко А.В., Воеводина Т.С. Проблема экологической оценки загрязнения почв нефтепродуктами // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2015. — № 10. — Ч. 1. — С. 147–151.
3. Грищенко О.М. Ботанические аномалии как поисково-разведочный критерий нефтегазоносности // Экология. — 1982. — Т. 1. — С. 18–22.
4. Дедков В.П., Гребенников А.С., Туркин Н.И. Рост и развитие растений на почве, загрязненной нефтью // Теоретические и прикладные аспекты биологии: Межвуз. сб. науч. тр.: Калинингр. ун-т. — Калининград, 1997. — 81 с.
5. Демиденко А.Я., Демурджан В.М., Шеянова А.Д. Изучение питательного режима почв, загрязненных нефтью // Агрохимия. — 1983. — Т. 9. — С. 100–103.
6. Донец Е.В., Григорьев А.И. Влияние нефтяного загрязнения на прорастание семян хвойных пород // Лесоведение. — 2008. — Т. 5. — С. 18–21.
7. Киреева Н.А., Водопьянова В.В. Мониторинг растений, используемых для фиторемедиации нефтезагрязненных почв // Экология и промышленность России. — 2007. — № 9. — С. 46–47.
8. Киреева Н.А., Галимзянова А.М., Мифтахова А.М. Микромицеты почв, загрязненных нефтью, и их фитотоксичность // Микология и фитопатология. — 2000. — Т. 34(1). — С. 36–41.
9. Киреева Н.А., Мифтахова А.М., Кузьяметов Г.Г. Рост и развитие сорных растений в условиях техногенного загрязнения почвы // Вестник Башкирского университета. — 2001. — Т. 1. — С. 32–34.
10. Киреева Н.А., Мифтахова А.М., Салахова Г.М. Рост и развитие растений яровой пшеницы на нефтезагрязненных почвах и при биоремедиации // Агрохимия. — 2006. — Т. 1. — С. 85–90.
11. Крятов И.А., Тонкопий Н.И., Ушакова О.В., Водянова М.А. Современные проблемы разработки гигиенических нормативов в почве // Гигиенические нормативы. — 2012. — С. 69–72.
12. Маслова С.П., Табаленкова Г.Н. Реакция корневищного злака *Phalaroides arundinacea* на загрязнение почвы нефтью // Агрохимия. — 2010. — Т. 8. — С. 66–71.
13. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. — М.: Изд-во МГУ, 1988. — 220 с.
14. Назаров А.В. Влияние нефтяного загрязнения почвы на растения // Вестник Пермского университета. — 2007. — Т. 5. — № 7. — С. 134–141.
15. Петухов В.Н., Фомченков В.М., Чузунов В.А. и др. Биотестирование почвы и воды, загрязненных нефтью и

- нефтепродуктами, с помощью растений // Прикладная биохимия и микробиология. — 2000. — Т. 36(6). — С. 652–655.
16. Седых В.Н., Игнатъев Л.А. Влияние отходов бурения и нефти на физиологическое состояние растений // Сибирский экологический журнал. — 2002. — Т. 1. — С. 47–52.
 17. Хазиев Ф.Х., Тишкина Е.И., Киреева Н.А., Кузяхметов Г.Г. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты экосистемы // Агрохимия. — 1988. — Т. 2. — С. 56–61.
 18. Халилова А.Ф. Устойчивость растений к углеводородному загрязнению на стадии прорастания // Проблемы агрохимии и экологии. — 2012. — Т. 2. — С. 47–58.
 19. Халимов Э.Н., Левин С.В., Гузев В.С. Экологические и микробиологические аспекты повреждающего действия нефти на свойства почвы // Вестник МГУ. — 1996. — Т. 17(2). — С. 59–64.
 20. Шаркова С.Ю., Полянскова Е.А., Парфенова Е.А. Состояние микробного комплекса почв при нефтезагрязнении // Известия ПГПИУ им. В.Г. Белинского. — 2011. — Т. 25. — С. 614–617.
 21. Alkorta I., Garbisu C. Phytoremediation of organic contaminants in soils // Bioresource Technology. — 2001. — Vol. 79(3). — P. 273–276.
 22. Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T. Bioremediation in the rhizosphere // Environmental Science and Technology. — 1993. — Vol. 27(13). — P. 2630–2636.
 23. April W., Sims R.C. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil // Chemosphere. — 1990. — Vol. 20. — P. 253–265.
 24. Baker J.M., Van Bavel C.H.M. Water transfer through cotton plants connecting soil regions of differing water potential // Agronomy Journal. — 1988. — Vol. 80(6). — P. 993–997.
 25. Besalatpour A. et al. Germination and growth of selected plants in a petroleum contaminated calcareous soil // Soil and Sediment Contamination. — 2008. — Vol. 17(6). — P. 665–676.
 26. Chrikishvili D.I. et al. Peptide conjugates of benzene and toluene metabolites in English ryegrass // Russian Journal of Plant Physiology. — 2006. — Vol. 53. — No. 4. — P. 456–462.
 27. Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W. Phytoremediation of contaminated soils // Trends in Biotechnology. — 1995. — Vol. 13(9). — P. 393–397.
 28. Cunningham S.D., Ow D.W. Promises and prospects of phytoremediation // Plant Physiol. — 1996. — Vol. 110. — P. 715–719.
 29. Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // Biotechnology Research International. — 2011. — Vol. 2011. — Article ID 941810, 13 pages. doi: 10.4061/2011/941810.
 30. Doty S.L. et al. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. — 2007. — Vol. 104(43). — P. 16816–16821.
 31. Durmishidze S.V. Metabolism of certain air-polluting organic compounds in plants (review) // Appl. Biochem. Microbiol. — 1977. — Vol. 13(6). — P. 646–653.
 32. Ferro A.M., Sims R.C., Bugbe B. Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil // Journal of Environmental Quality. — 1994. — Vol. 23. — P. 272–279.
 33. Ferro A.M. et al. Fate of benzene in soils planted with alfalfa: uptake, volatilization, and degradation // Phytoremediation of soil and water contaminants. — Washington: Am. Chem. Soc., 1997. — P. 223–237.
 34. Frick C.M., Germida J.J., Farrell R.E. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites // In: Technical seminar on chemical spills, 1999. — P. 105a–124a.
 35. Gaskin S., Soole K., Bentham R. Screening of Australian native grasses for rhizoremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil // International Journal of Phytoremediation. — 2008. — Vol. 10(5). — P. 378–389.
 36. Gladkov E.A., Dolgikh Y.I., Gladkova O.V. Assessing the possibility of the use of cell selection in phytoremediation // Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences. Global Publications. — 2016. — No. 2. — P. 223–226.
 37. Glick B.R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment // Biotechnology Advances. — 2003. — Vol. 21(5). — P. 383–393.
 38. Khan S. et al. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils // Chemosphere. — 2013. — Vol. 90(4). — P. 1317–1332.
 39. Kirk J.L. et al. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil // Environmental Pollution. — 2005. — Vol. 133. — P. 455–465.
 40. Knee E.M. et al. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source // The American Phytopathological Society. — 2001. — Vol. 4(6). — P. 775–784.
 41. Kuiper I. et al. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2004. — Vol. 17(1). — P. 6–15.
 42. Lin X. et al. Evaluation of plant-microorganism synergy for the remediation of diesel fuel contaminated soil // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. — 2008. — Vol. 81(1). — P. 19–24.
 43. Macek T., Mackova M., Káš J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation // Biotechnology Advances. — 2000. — Vol. 18(1). — P. 23–34.
 44. Masakorala K. et al. Phytotoxicity of long-term total petroleum hydrocarbon-contaminated soil — a comparative and combined approach // Water, Air, and Soil Pollution. — 2013. — Vol. 224(5). — P. 1–12.

45. *Phillips L.A. et al.* Field-scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatments // *Applied Soil Ecology*. – 2009. – Vol. 42(1). – P. 9–17.
46. *Radwan S.S. et al.* Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oil Kuwaiti desert // *Microbiological Research*. – 1998. – Vol. 153(3). – P. 247–251.
47. *Raskin I., Smith R.D., Salt D.E.* Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment // *Current Opinion in Biotechnology*. – 1997. – Vol. 8(2). – P. 221–226.
48. *Rowell M.J.* The effect of crude oil spills on soils. A review of literature // *The reclamation of agricultural soils after oil spills. Part 1: Research* (Toogood J.A., ed.). – Alberta Institute of Pedology publication. University of Alberta, 1977. – P. 1–33.
49. *Salanitro J.P. et al.* Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment // *Environmental Science and Technology*. – 1997. – Vol. 31(6). – P. 1769–1776.
50. *Salt D.E. et al.* Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic elements from the environment using plants // *Biotechnology*. – 1995. – Vol. 13. – P. 468–475.
51. *Shahsavari E. et al.* Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil // *Water, Air and Soil Pollution*. – 2013. – Vol. 224(4). – P. 1–14.
52. *Siciliano S.D., Germida J.J.* Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria // *Environmental Reviews*. – 1998. – Vol. 6(1). – P. 65–79.
53. *Tsao S.M., Yin M.C.* In vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils // *Journal of Medical Microbiology*. – 2001. – Vol. 50(7). – P. 646–649.
54. *Ujowundu C.O., et al.* Biochemical and physical characterization of diesel petroleum contaminated soil in Southeastern Nigeria // *Research Journal of Chemical Sciences*. – 2011. – Vol. 1(8). – P. 57–62.
55. *Yavari S., Malakahmad A., Sapari N.B.* A review on phytoremediation of crude oil spills // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2015. – Vol. 226(8). – P. 226–279. doi:10.1007/s11270-015-2550-z.

INFLUENCE OF OIL AS AN UNFAVORABLE FACTOR ON PLANTS AND PHYTOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED TERRITORIES

A.Yu. STEPANOVA, A.I. SOLOV'EVA, E.A. GLADKOV

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow

The influence of oil as an unfavorable environmental factor on various plant species is considered. Despite the fact that oil has a high level of toxicity for most plants, there are species not only resistant to oil, but also capable of its utilization. Plants with phytoremediation properties are listed. The mechanisms of phytoremediation of oil contaminated territories are characterized, the main one of them is rhizodegradation, in which plants create conditions for the development of oil-oxidizing bacteria.

Keywords: oil, plants, phytoremediation, rhizodegradation.

ПРОБЛЕМА ОХРАНЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ

Т.М. ЛЫСЕНКО*

ФГБУН Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти

В статье представлен обзор существующих на сегодняшний момент взглядов на проблему охраны растительных сообществ в России и за рубежом, а также принципов и критериев выделения редких и нуждающихся в охране растительных сообществ.

Ключевые слова: охрана растительных сообществ, редкие растительные сообщества, Зеленая книга.

Введение

1980–1990 годы ознаменовались выходом в свет «Зеленых книг», под которыми подразумевали Кадастр уникальных, или, напротив, типичных ландшафтов. Начало было положено «Зеленой книгой степного края» (Чибилев, 1983) [25], вслед за ней вышли «Зеленая книга Республики Татарстан» (1993) [10], «Зеленая книга Оренбургской области: Кадастр объектов Оренбургского природного наследия» (1996) [9].

Есть и другой, но близкий подход — под «Зеленой книгой» понимается список особо охраняемых природных территорий — например, «Зеленая книга Поволжья: Охраняемые природные территории Самарской области» (1995) [7].

В последние десятилетия в странах Западной и Восточной Европы — Германии (Brinkmann, 1978 [30]; Preising, 1978 [43]; Brandes, 1981 [29]; Bergmeier, Nowak, 1983 [28]; Dierßen, 1982, 1983, 1993 [31, 32, 33]; Fukarek, 1985 [34]; Knapp u. a., 1985 [39]; Sauer, Weyrath, 1988 [45]; Klemm u. a., 1989 [38]; Westhoff u. a., 1993 [48]; Rennwald, 2000 [44]), Эстонии (Paal, 1998) [42], Австрии (Wittmann, Strobl, 1990) [49], Швейцарии (Steiger, 1998) [47], Чешской Республики (Moravec et al., 1983) [41], Украины (Зеленая книга Украинской ССР..., 1987 [12]; Зелена книга України..., 2009 [6]) и в разных регионах России — Сибири (Зеленая книга Сибири..., 1996) [11, 23], Республики Башкортостан (Журавлева, 1999а, б [4, 5]; Мартыненко, 2009 [18]; Ямалов, 2011 [27]); Самарской (Саксонов и др., 2004 [22]; Лысенко, 2006,

2015 [15, 16]; Саксонов и др., 2006 [21]; Lysenko, Böcker, 2006 [40]), Брянской (Зеленая книга Брянской..., 2012) [8], Саратовской (Давиденко и др., 2015) [2] областях — стали активно разрабатываться так называемые «Зеленые книги растительных сообществ», целью которых представляется выявление нуждающихся в охране сообществ: естественной среды обитания редких и исчезающих видов растений и животных, поскольку именно в рамках сообщества протекает эволюция вида и именно в нем он может сохраниться. Сохранение фитоценозов способствует сохранению биогеоценозов и в дальнейшем биосферы в целом. В этом заключается экосистемный подход.

Основоположником теоретических разработок в этом направлении является Е.М. Лавренко (1971) [14], считавший, что наличие редких видов, особенно в статусе доминантов и содоминантов, служит одним из критериев охраны сообществ, а также то, что необходимо охранять и зональные (типичные) сообщества и фитоценозы, находящиеся на границе своих ареалов.

Современное состояние охраны растительных сообществ в России и за рубежом

В статье представлен обзор существующих на сегодняшний момент взглядов на проблему охраны растительных сообществ в России и за рубежом, а также принципов и критериев выделения редких и нуждающихся в охране растительных сообществ.

К настоящему времени лишь для нескольких регионов России созданы «Зеленые книги растительных сообществ». В 1996 г. вышла в свет «Зеленая книга Сибири» [11], в которой использованы сформулированные В.П. Седельниковым [23] следующие принципы и критерии для выделения редких и нуждающихся в охране растительных сообществ: 1) научная значимость (эталон коренной растительности; эталон, отражающий историю формирования растительного покрова и в целом

© 2017 г. Лысенко Т.М.

* **Автор для переписки:**

Лысенко Татьяна Михайловна

доктор биол. наук,

доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории проблем фиторазнообразия, Институт экологии Волжского бассейна РАН

E-mail: ltm2000@mail.ru

геохронологию; сокращающие ареал в силу исторических причин и антропогенных факторов; находящиеся на границе ареала, в отрыве от него или имеющие ограниченный ареал на территории Сибири); 2) сообщества как местообитания видов (эндемичных и реликтовых; редких и нуждающихся в охране, внесенных в Красные книги); 3) ресурсная значимость (эталон высокой продуктивности; источник ценного растительного сырья; источник и резерв ценных интродуцентов; резерв для восстановления уничтоженных и трансформированных экосистем). В этой книге использован эколого-фитоценотический подход к классификации растительности, установлено 196 единиц охраны, из них степных сообществ — 51, лесных — 46, тундровых — 33, болотных — 18, луговых — 10, пойменных — 20, высокогорных — 13, галофитных — 5.

В 1997 году была опубликована «Красная книга растительных сообществ бывшего СССР» (Solomeshch et al., 1997) [46], в которой представлен список редких и нуждающихся в охране синтаксонов до уровня союза. В ней использован эколого-флористический подход к классификации растительности.

Одной из эффективной основ для охраны растительного покрова и создания особо охраняемых природных территорий уфимские ученые (Миркин, Наумова, 1998 [19]; Миркин и др., 2000 [20]; Мартыненко, Миркин, 2003 [17]) считают эколого-флористическую классификацию растительности, поскольку она основывается на анализе полных флористических списков и позволяет оценить распространение редких, эндемичных и реликтовых видов, а также установить тонкие флористические и экологические различия между фитоценозами. Синтаксоны, выделенные на основе использования этого подхода, четко экологически охарактеризованы и достаточно легко могут быть трансформированы в типологические единицы, используемые в природоохранной, лесо- и луговодческой практике. Полные флористические списки синтаксонов содержат информацию о редких компонентах флор. Диагностические виды в основном соответствуют эколого-ценотическим группам, выделяемым на синтаксономической основе и могут быть использованы при фитоиндикации.

На основе анализа и обобщения опыта зарубежных и российских исследователей в Лаборатории геоботаники и охраны растительности ИБ УНЦ РАН (г. Уфа) был предложен набор важнейших характеристик и разработаны шкалы для оценки природоохранной значимости растительных сообществ. В 1999 году была подготовлена и защищена кандидатская диссертация Журавлевой С.Е. (1999 а, б) [4, 5], в которой изло-

жена эта система, подразумевавшая сначала получение сообществами экспертной оценки по 6 относительно независимым критериям: 1) флористико-фитоценотическая значимость, определяемая наличием редких видов (видов, занесенных в Красные книги разных уровней, эндемичных, реликтовых, видов на границе ареала, видов, редких в силу особенностей их экологии и биологии), уникальностью их сообществ, расположением на границе ареала, сложностью структуры. Наличие редких видов определяет собственно флористическую значимость; 2) редкость, основанная на характере распространения сообществ и определяемая размерами их ареалов и тем, насколько часто они встречаются в пределах своего ареала; 3) естественность, показывающая степень отклонения сообщества от своего первоначального состояния вследствие воздействия на него антропогенных факторов вплоть до полной деградации (климаксовые сообщества, естественные, но не климаксовые, традиционно используемые, интенсивно используемые, синантропные); 4) сокращение занимаемой площади служит важным показателем современного состояния сообществ и тенденции дальнейшего изменения занимаемой ими площади; 5) восстанавливаемость — способность сообществ возвращаться в исходное состояние после естественных и антропогенных нарушений. Выделено 5 категорий по времени, необходимому для восстановления сообществ; 6) обеспеченность охраной, позволяющая в совокупности с тенденцией к сокращению ареала и способностью к восстановлению оценить опасность исчезновения сообществ.

Использование этих критериев приводит к получению двух интегральных показателей, которые определяют природоохранный статус растительных сообществ: 1) опасность исчезновения; 2) категория охраны.

Оценка опасности исчезновения (угрожаемость) проводится с учетом типа редкости, сокращения занимаемой площади, способности к самовосстановлению, обеспеченности охраной, наличия угрожающих факторов. Для оценки статуса редких видов использована шкала МСОП (IUCN, 1994) [36]: Ex (Extinct) — исчезнувшие, EW (Extinct in the Wild) — исчезнувшие в природе, Cr (Critically endangered) — критически исчезающие, En (Endangered) — исчезающие, Vu (Vulnerable) — уязвимые, LR (Lower Risk) — с пониженным риском, DD (Data Deficient) — виды, для оценки которых недостаточно данных.

Категория охраны отражает ценность растительного сообщества и определяется как интегральный показатель следующих параметров: 1) флористико-фитоценотической значимости; 2) характера распространения;

3) естественности; 4) сокращения занимаемой площади. Использована 4-балльная шкала оценки: высшая, высокая, средняя, низкая.

После определения категории охраны растительного сообщества предлагается оценка статуса охраняемой территории как производной величины от категорий охраны всех находящихся на определенной территории сообществ.

Описанная выше система была применена В.Б. Мартыненко (2009) [18] для оценки природоохранной значимости исследованных лесов Южно-Уральского региона и С.М. Ямаловым (2011) [27], с изменениями, для оценки природоохранной значимости ассоциаций и сообществ травяной растительности Южно-Уральского региона.

В.А. Глазунов (2003) [1] разработал систему оценки природоохранной значимости растительных сообществ лесостепной зоны Тюменской области, используя опыт сибирских и башкирских коллег и внося дополнения, которые учитывают региональные особенности территории исследований и влияют на оценку степени редкости сообществ и опасности их исчезновения. Это: 1) полное отсутствие эндемичных и очень небольшое количество реликтовых видов во флоре, которые практически не оказывают никакого влияния на степень флористической значимости для большинства сообществ; 2) нахождение значительного количества видов, в том числе доминантов и содоминантов, на границе своего распространения, что определяет флористическую и фитоценологическую значимость большинства сообществ; 3) уникальное сочетание в сообществах видов с европейским и азиатским типами ареалов, обусловленное географическим положением.

В 2006 году была опубликована «Зеленая книга Самарской области» (Саксонов и др., 2006) [21], в которой для выделения редких и нуждающихся в охране растительных сообществ были использованы следующие критерии: 1) научная значимость (эталон коренной растительности; эталон, отражающий историю формирования растительного покрова и геохронологию в целом; сокращающие ареал в силу исторических причин и антропогенных факторов; находящиеся на границе ареала, в отрыве от него или имеющие ограниченный ареал на территории Самарской области); 2) характер размещения сообществ по ареалу синтаксона (редкость) (8 градаций); 3) природоохранный статус сообществ (дестабилизирующие факторы, естественность, сокращение площади, восстановление, опасность исчезновения); 4) параметры биоразнообразия и структурных фитоценологических особенностей сообщества как местообитания видов (видовое

богатство, видовая насыщенность, количество редких видов); 5) категории современного состояния охраны сообществ и требуемого статуса (современная обеспеченность охраной, требуемый статус охраны).

В «Зеленой книге Самарской области» использован эколого-фитоценологический подход к классификации растительности, однако во многих случаях при характеристике единиц охраны указаны союзы, порядки и классы в соответствии с эколого-флористическим подходом к классификации растительности. Всего для Самарской области установлено 87 единиц охраны, из них степных сообществ — 51, лесных — 13, галофитных — 9, прибрежно-водных — 9, скальных — 5. Составлены паспорта (черки) растительных сообществ. Позднее для редких и рекомендованных к охране галофитных сообществ были проведены оценки их природоохранной значимости и представленности на ООПТ (Лысенко, 2015) [15].

Брянские ботаники при создании «Зеленой книги Брянской области (растительные сообщества, нуждающиеся в охране)» (2012) [8] провели сравнительный анализ существующих на момент работы над книгой подходов и создали балльную шкалу для установления природоохранного статуса растительных сообществ, в которой экспертные показатели объединены в 4 блока: 1) редкость (R) (экспертные показатели: а) распространение сообществ в пределах ареала; б) распространение местообитания сообщества; в) распространение сообществ в регионе; г) редкость ценозоообразователя; д) участие прочих редких видов в ценофлоре; е) сокращение площади) с максимальным количеством баллов 19; 2) специальные характеристики сообществ (G) (экспертные показатели: а) экологическая амплитуда сообщества; б) способность к восстановлению; в) естественность; г) устойчивость к антропогенному воздействию) с максимальным количеством баллов 8; 3) значение сообществ в природе и хозяйственной деятельности человека (V) (экспертные показатели: а) средозащитное; б) экономическое; в) культурно-рекреационное; г) научное) с максимальным количеством баллов 8.

Природоохранный статус сообществ авторы приводят в очерках в виде формулы, в которой указаны: категория охраны, общая сумма баллов, сумма баллов по каждому из трех экспертных показателей (R, G, V) и обеспеченность территориальной охраной (P).

В «Зеленой книге Брянской области» был применен эколого-флористический подход к классификации растительности. В книгу включено 45 типов растительных сообществ, в том числе 33 типа редких сообществ, 7 эталонных сообществ, 5 редких сообществ

мохообразных. Типы растительных сообществ отнесены к 39 ассоциациям, 4 субассоциациям и 2 безранговым сообществам в составе 17 классов растительности. Составлены паспорта (очерки) растительных сообществ.

Мы считаем удачным выделение при создании региональных Зеленых книг двух категорий растительных сообществ — редких растительных сообществ и эталонных растительных сообществ, — предпринятое брянскими коллегами (Зеленая книга Брянской..., 2012) [8]. К редким брянские ботаники относят сообщества, представленные в области на границе своего распространения, а также сообщества с участием редких видов растений, являющихся, как правило, ценозообразователями. Эталонные сообщества — основные зональные сообщества региона, отражающие потенциал типичных местообитаний, обусловленные конкретными зональными условиями.

Проблема охраны растительных сообществ в России действительно является таковой и состоит в том, что «Зеленые книги» регионов России не имеют законодательной основы, представленные в них результаты исследований редких растительных сообществ имеют рекомендательный характер и могут быть использованы при проектировании и создании экологических сетей, отдельных ООПТ, зонировании в национальных и природных парках, для мониторинга растительности.

В зарубежных странах к настоящему времени проведена большая работа по проблеме сохранения растительных сообществ.

С.М. Стойко (1983) [24] на основе использования флористических, ботанико-географических, фитоценологических и других критериев, имеющих природоохранное значение, выделил 7 категорий сообществ, нуждающихся в охране. Затем это разделение фитоценозов было учтено Ю.Р. Шеляг-Сосонко и С.М. Стойко (1987) [26] для разработки принципов выделения редких, исчезающих и типичных растительных сообществ при создании «Зеленой книги Украинской ССР...» (1987) [12]. 1-я категория включает в себя фитоценозы, эдификаторами и соэдификаторами которых являются внесенные в Красные книги таксоны высокого ранга, характеризующиеся неустойчивостью при протекании сукцессий и имеющие тенденции к сокращению ареала. 2-я категория объединяет коренные фитоценозы, образованные теми же видами, но отличающиеся устойчивостью в ходе сукцессии и стабильностью ареала. К 3-й категории принадлежат коренные сообщества, в которых различные фитоценологические позиции занимают обычные виды, но с пониженным эколого-биологическим потенциалом на

границе ареала или высотного распределения, а также интразональные фитоценозы, заслуживающие охраны по ботанико-географическим или хорологическим характеристикам. 4-я категория объединяет фитоценозы, экологически и консорционно связанные с исчезающими представителями животного мира. 5-я категория включает в себя коренные фитоценозы с редкими сочетаниями фитоцено типов, но представляющими интерес в фитоценологическом или хозяйственном отношении, а также фитоценозы, имеющие научно-исследовательское или хозяйственно-эталонное значение. 6-я категория включает в себя культуруфитоценозы из перспективных интродуцированных или аборигенных видов, имеющих экспериментальное или хозяйственно-эталонное значение. 7-я категория объединяет фитоценозы, ранее широко распространенные, но ставшие редкими в результате естественно-исторических причин, а антропогенных или стихийных пожаров.

В 2009 г. вышло второе издание «Зеленой книги Украины» [6]. Она является официальным государственным документом, в котором собраны сведения о современном состоянии редких, находящихся под угрозой исчезновения, и типичных природных растительных сообществ, подлежащих охране. «Положение о Зеленой книге Украины» утверждено постановлением Кабинета Министров Украины от 29 августа 2002 г., а методика установления природоохранного статуса сообществ утверждена приказом Министерства охраны и рационального природопользования Украины от 27.05.2009 г. «Зеленая книга Украины» является основой для разработки охранных мероприятий по сохранению, воспроизводству и использованию занесенных в нее растительных сообществ.

В 2000 г. был опубликован «Указатель и Красный список растительных сообществ Германии» (Rennwald, 2000) [44], в котором представлены сведения о 807 редких и нуждающихся в охране ассоциаций и сообществ.

В странах Евросоюза реализован проект Natura 2000 (NATURA 2000) — сеть территорий, где требуется защита определенных видов животных и растений и их среды обитания. Юридическим основанием проекта NATURA 2000 является Директива Совета Европейского Союза 79/409/ЕЭС от 2 апреля 1979 г. по охране диких птиц, а также Директива Совета Европейского Союза 92/43/ЕЭС от 21 мая 1992 г. об охране естественных мест обитания и дикой фауны и флоры. В правовых предписаниях проекта перечислены виды животных и растений и их среда обитания, которые по причине их редкости и требований к условиям

обитания особенно нуждаются в защите; это, в первую очередь, относится к видам и их ареалам, находящимся под угрозой исчезновения. По предложению государств-участников определяются конкретные области для осуществления защиты этих видов и их ареалов. Области разделены на 7 биогеографических регионов Евросоюза — альпийский, атлантический, полярный, континентальный, макаронезийский, средиземноморский и паннонский. Сеть NATURA 2000 включает в себя охраняемые территории, на которых должно обеспечиваться сохранение более 180 видов и подвидов птиц, а также особые заповедники, в которых призвано обеспечить сохранение более 250 различных ареалов, более 200 видов животных и более 430 видов растений. NATURA 2000 сегодня включает в себя более 20% территории Европейского Союза. Государства-участники несут ответственность за охраняемые территории и должны обеспечивать сохранность определяемых правовыми предписаниями видов и их ареалов. В пределах этих территорий по-прежнему допускается ведение хозяйственной деятельности, например, сельскохозяйственной, однако она должна согласовываться с целью сохранения видов и их ареалов.

Кроме того, в европейских странах реализуется проект организации Ключевых ботанических территорий для обеспечения охраной наиболее ценных с ботанической точки зрения объектов (Европейская стратегия..., 2003 [3]; Ключевые..., 2004 [13]).

Совсем недавно в Евросоюзе завершен крупный проект «Красный список местообитаний Европы», который привел к опубликованию результатов работы в двух частях: первая часть включает в себя списки морских местообитаний (Gubbay et al., 2016) [35], вторая часть — наземных и пресноводных (Janssen et al. 2016) [37].

Заключение

Таким образом, растительные сообщества как среда обитания редких видов растений и животных нуждаются в охране в разных регионах России. Этот вопрос требует дальнейшей работы на разных уровнях.

Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ 16-04-00747а.

Литература

1. Глазунов В.А. Принципы выделения и категории редких видов и растительных сообществ в зонах контакта биогеографических зон (на примере территории лесостепного юга

- Тюменской области) // Успехи современного естествознания. — 2003. — № 11. — С.139—140.
2. Давиденко О.Н., Невский С.А., Лысенко Т.М., Гребенюк С.И. Редкие галофитные сообщества Саратовской области. Сообщение 1. Растительность солончатых водоемов и солончаков гидроморфных // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: химия, биология, экология. — 2015. — Т. 15. — № 4. — С. 99—106.
3. Европейская стратегия безопасности — безопасная Европа в лучшем мире. — Люксембург: Бюро официальных публикаций Европейских Сообществ, 2009. — 43 с.
4. Журавлева С.Е. Синтаксономическое обоснование выбора охраняемых растительных сообществ (на примере некоторых сообществ Республики Башкортостан): автореф. дис... канд. биол. наук. — Уфа, 1999б. — 18 с.
5. Журавлева С.Е. Синтаксономическое обоснование выбора охраняемых растительных сообществ (на примере некоторых сообществ Республики Башкортостан): дис. ... канд. биол. наук. — Уфа, 1999а. — 180 с.
6. Зелена книга України. Под. ред. Я.П. Дідуха. — Київ, 2009. — 448 с.
7. «Зеленая книга» Поволжья: Охраняемые природные территории Самарской области / Сост. А.С. Захаров, М.С. Горелов. — Самара: Кн. изд-во, 1995. — 352 с.
8. Зеленая книга Брянской области (растительные сообщества, нуждающиеся в охране): монография / Под ред.: А.Д. Булохова. — Брянск: ГУП «Брянск. обл. полигр. объединение», 2012. — 144 с.
9. Зеленая книга Оренбургской области: Кадастр объектов Оренбургского природного наследия / Под ред.: А.А. Чибилева. — Оренбург: ДиМур, 1996. — 257 с.
10. Зеленая книга Республики Татарстан / Под ред.: Н.П. Торсуева. — Казань: КГУ, 1993. — 421 с.
11. Зеленая книга Сибири: редкие и нуждающиеся в охране растительные сообщества / Под ред.: И.Ю. Коропачинского. — Новосибирск: Наука, 1996. — 396 с.
12. Зеленая книга Украинской ССР: редкие, исчезающие и типичные, нуждающиеся в охране растительные сообщества. Под ред. Ю.Р. Шеляг-Сосонко. — Киев: Наукова думка, 1987. — 214 с.
13. Ключевые ботанические территории Северной Евразии: сб. статей. Вып.1. — М.: Изд-во Представительства Всемирного Союза Охраны Природы (IUCN) для России и стран СНГ, 2004. — 75 с.
14. Лавренко Е.М. Об охране биологических объектов в СССР / В кн. Вопросы охраны биологических объектов. — Л.: Наука, 1971. — С. 6—13.
15. Лысенко Т.М. Охрана растительности засоленных почв лесостепной и степной зон в Поволжье // Известия Самарского НЦ РАН. — 2015. — Т. 17. — № 4—5. — С. 825—841.
16. Лысенко Т.М. Редкие и нуждающиеся в охране фитоценозы Самарской области. I. Галофитные сообщества //

- Ботанический журнал. — 2006. — Т. 91. — № 1. — С. 133–143.
17. Мартыненко В.Б., Миркин Б.М. О формальных и неформальных оценках флористического разнообразия (на примере сосняков Южного Урала) // Экология. — 2003. — № 5. — С. 336–340.
 18. Мартыненко В.Б. Синтаксономия лесов Южного Урала как теоретическая основа развития системы их охраны: автореф. дис... докт. биол. наук. — Уфа, 2009. — 32 с.
 19. Миркин Б.М., Наумова Л.Г. Наука о растительности (история и современное состояние основных концепций). — Уфа: Гилем, 1998. — 413 с.
 20. Миркин Б.М., Соломец А.И., Журавлева С.Е. Растительность России в ареале синтаксономии Браун-Бланке: развитие подхода и результаты // Журнал общей биологии. — 2000. — Т. 61. — № 1. — С. 5–21.
 21. Саксонов С.В., Лысенко Т.М., Ильина В.Н., Конева Н.В., Лобанова А.В., Матвеев В.И., Митрошенкова А.Е., Симонова Н.И., Соловьева В.В., Ужамецкая Е.А., Юрицына Н.А. Зеленая книга Самарской области: редкие и охраняемые растительные сообщества / Под ред.: Г.С. Розенберга и С.В. Саксонова. — Самара: СамНИЦ РАН, 2006. — 201 с.
 22. Саксонов С.В., Розенберг Г.С., Лысенко Т.М., Голуб В.Б. К вопросу о создании Зеленой книги Самарской области // Известия Самарского НИЦ РАН. Спец. вып. «Общие проблемы экологии», 2004. — С. 71–79.
 23. Седельников В.П. Принципы выделения и паспортизации нуждающихся в охране редких и исчезающих растительных сообществ // Зеленая книга Сибири / Под ред.: И. Ю. Коропачинского. — Новосибирск, 1996. — С. 13–17.
 24. Стойко С.М. Экологические основы охраны редких, уникальных и типичных фитоценозов // Ботанический журнал. — 1983. — Т. 68. — № 11. — С. 1574–1583.
 25. Чибилев А.А. Зеленая книга степного края. — Челябинск: Южно-Уральское кн. изд-во, 1983. — 156 с.
 26. Шеляг-Сосонко Ю.Р., Стойко С.М. Принципы выделения и оценка редких, исчезающих и типичных растительных сообществ // Зеленая книга Украинской ССР: Редкие, исчезающие и типичные, нуждающиеся в охране растительные сообщества / Под общ. ред.: Ю.Р. Шеляг-Сосонко. — Киев: Наукова Думка, 1987. — С. 23–27.
 27. Ямалов С.М. Синтаксономия и динамика травяной растительности Южно-Уральского региона: автореф. дис... докт. биол. наук. — Уфа, 2011. — 31 с.
 28. Bergmeier E., Nowak B. Rote Liste der Pflanzengesellschaften der Wissen und Weiden Hessens (Stand: 1983). Vogel und Umwelt // Zeitschr. f. Vogelkunde. u. Naturschutz in Hessen). — 1988. — Н. 5(1). — С. 23–33.
 29. Brandes D. Gefährdete Ruderalgesellschaften in Niedersachsen und Möglichkeiten zu ihrer Erhaltung // Göttinger Floristische Rundbriefe. — 1981. — Н. 14(4). — С. 90–98.
 30. Brinkmann H. Schützenswerte Pflanzen und Pflanzengesellschaften der Senne // Berichte des Naturwissenschaftlichen Vereins Bielefeld, 1978. Sonderheft. — S. 33–68.
 31. Dierßen K. Rote Liste der Pflanzengesellschaften Schleswig-Holstein (Stand: 1983) // Schriftenreihe Landesamt für Naturschutz und Landschaftspflege Schleswig-Holstein. — 1983. — Н. 6. — 123 S.
 32. Dierßen K. Rote Liste der Pflanzengesellschaften Schleswig-Holsteins // Schriftenreihe Landesamt für Naturschutz und Landschaftspflege Schleswig-Holstein. — 1982. — Н. 6. — С. 1–152.
 33. Dierßen K. Rote Liste der Pflanzengesellschaften — Bearbeitungsstand, Entwicklungsbedarf, Defizite. Grundlagen und Probleme einer Rote Liste der gefährdeten Biotoptypen Deutschlands // Schriftenreihe Landesamt für Naturschutz und Landschaftspflege Schleswig-Holstein. — 1993. — Н. 38. — С. 87–101.
 34. Fukarek F. Rote Liste der verschwundenene und gefährdeten Höheren Pflanzen von Mecklenburg, 3. Fassung // Bot. Rundbr. Bez. Neubrandenburg. — 1985. — Н. 14(4). — С. 3–43.
 35. Gubbay S., Sanders N., Haynes T., Janssen J.A.M., Rodwell J.R., Nieto A., García Criado M., Beal S., Borg J., Kennedy M., Micu D., Otero M., Saunders G., Calix M. European Red List of Habitats Part 1. Marine habitats. — Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2016. — 52 p. doi: 10.2779/032638.
 36. IUCN red List Categories. Prepared by the IUCN Species Survival Commission. As approved by the 40th Meeting of the IUCN Council (Switzerland, Gland, 30 November 1994). — Gland, Published by IUCN, 1994. — P. 1–21.
 37. Janssen J.A.M., Rodwell J.S., García Criado M., Gubbay S., Haynes T., Nieto A., Sanders N., Landucci F., Loidi J., Ssymank A., Tahvanainen T., Valderrabano M., Acosta A., Aronsson M., Arts G., Attorre F., Bergmeier E., Bijlsma R.-J., Bioret F., Biță-Nicolae C., Biurrun I., Calix M., Capelo J., Čarni A., Chytrý M., Dengler J., Dimopoulos P., Essl F., Gardfjell H., Gigante D., Giusso del Galdo G., Hájek M., Jansen F., Jansen J., Kapfer J., Mickolajczak A., Molina J.A., Molnár Z., Paternoster D., Piernik A., Poulin B., Renaux B., Schaminée J.H.J., Šumberová K., Toivonen H., Tonteri T., Tsiripidis I., Tzonev R., Valachovič M. European Red List of Habitats Part 2. Terrestrial and freshwater habitats. — Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2016. — 44 p. doi: 10.2779/091372.
 38. Klemm G., Illig H., Großer K.-H., Jentsch H., Krausch H.D., Pietsch W. Gefährdete Pflanzengesellschaften der Niederlausitz // Natur und Landschaft im Bezirk Cottbus (NLBZ). — 1989. — Sonderheft. — S. 1–86.
 39. Knapp H.D., Jeschke L., Succow M. (u. Miarb. von Hempel W., Hilbig W., Krausch H.-D., Pietsch W., Voigtländer U. Gefährdete Pflanzengesellschaften auf dem Territorium der DDR // Kulturbund der DDR, Zentralvorstand der Gesellschaft für Natur und Umwelt, Zentraler Fachausschuß Botanik, 1985. — 128 S.

40. *Lysenko T., Böcker R.* Bemühungen zum Schutz seltener Pflanzengesellschaften am Beispiel von Halophytenzoosen des Samara-Gebietes // Berichte des Institutes für Landschafts- und Pflanzenökologie der Universität Hohenheim. — 2006. — H. 14/15/16 (2004–2006). — S. 115–126.
41. *Moravec J., Balátová-Tuláčková E., Hadač E., Hejný S., Jeník J., Kolbek J., Kopecký K., Krahulec F., Kropáč Z., Neuchásl R., Rybníček K., Vicherek J.* Rostlinná společenstva České socialistické republiky a jejich ohrožení // Severočeskou Přír., Příl., 1983. — Vol. 1. — 110 p.
42. *Paal J.* Rare and threatened plant communities of Estonia // Biodiversity and Conservation. — 1998. — Vol. 7. — P. 1027–1049.
43. *Preisig E.* Verschollene und gefährdete Pflanzengesellschaften in Niedersachsen (Rote Liste der Pflanzengesellschaften. 1. Fassung), 1978. — 79 S. [hektogr. Mskr.]
44. *Rennwald E.* Verzeichnis und Rote Liste der Pflanzengesellschaften Deutschlands // Schriftreihe für Vegetationskunde. — 2000. — H. 35. — 810 S.
45. *Sauer E., Weyrath U.* Rote Liste der gefährdeten Pflanzengesellschaften // Rote Liste — Bedrohte Tier- und Pflanzenarten im Saarland. — Saarbrücken: Ministerium für Umwelt des Saarlandes, 1988. — S. 117–121.
46. *Solomeshch A., Mirkin B., Ermakov N. et al.* Red data book of plant communities in the former USSR. — Birmingham: Templar Print & Design Ltd., 1997. — 70 p.
47. *Steiger P. (u. Mitwirk. von Carraro G., Frey H.-U., Frick A.).* Wälder der Schweiz. Von Lindegrün zu Lärchengold. Vielfalt der Waldbilder und waldgesellschaften in der Schweiz. 3. Aktualisierte Auflage. — Thun: Ott Verlag, 1998. — 361 S.
48. *Westhoff V., Hobohm C., Schaminée J.H.J.* Rote Liste der Pflanzengesellschaften des Naturraumes Wattenmeer unter Berücksichtigung der ungefährdeten Vegetationseinheiten // Tuexenia. — 1993. — H. 13. — S. 109–140.
49. *Wittmann H., Strobl W.* Gefährdete Biotypen und Pflanzengesellschaften in Salzburg — Ein erster Überblick // Naturschutzbeiträge. — 1990. — H. 9. — S. 1–81.

THE PROBLEM OF PROTECTING PLANT COMMUNITIES

T.M. LYSENKO

Institute of Ecology of the Volga Basin, RAS, Togliatti

The article presents an overview of the current views on the problem of protecting plant communities in Russia and abroad, as well as the principles and criteria for the allocation of rare and needy protection of plant communities.

Keywords: protection of plant communities, rare plant communities, Green book.

МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

О.А. ВОЛОХ¹, А.В. КОМИССАРОВ^{1*}, Д.Н. БИБИКОВ¹, К.И. ХОЛМАТОВ¹,
Н.Г. АВДЕЕВА¹, А.К. НИКИФОРОВ^{1,2}

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,
²Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Саратов

Представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам культивирования туляреми́ного микроба. Проанализированы данные о качественном и количественном составе питательных сред, используемых для выращивания *Francisella tularensis*. Изложены сведения о следующих методах, применяемых в технологическом процессе культивирования туляреми́ного микроба: периодическое культивирование, периодическое с подпиткой, отъемно-доливное выращивание микроорганизмов. Рассмотрены их преимущества и недостатки. Проанализировано воздействие ряда параметров: содержание растворенного кислорода и источника энергетического питания, рН культуральной жидкости, температура, продолжительность культивирования на размножение туляреми́ного микроба. Проведенный анализ данных литературы позволяет выбрать питательную среду и способ проведения процесса культивирования *Francisella tularensis*, а также учесть влияние описанных в обзоре параметров при разработке технологии производства иммунобиологических препаратов для диагностики и профилактики туляремии.

Ключевые слова: культивирование, *Francisella tularensis*, питательные среды, технологические параметры.

Введение

Применение конкретного метода культивирования микроорганизма определяется не только его питательными потребностями, но и целями получения биомассы. Оптимальная композиция химических форм биогенных элементов в питательной среде способствует росту и развитию микроорганизмов. Питательные потребности *F. tularensis* приближенно могут быть установлены по качественно-количественному составу различных элементов этого микроба.

Проведенный поиск литературы по указанному вопросу показал практически полное отсутствие данных. В монографии Олсуфьева Н.Г. [14] имеется небольшой подраздел, посвященный химическому составу *F. tularensis*. В нем констатируется, что «... содержание белка, нуклеиновых кислот и нуклеопротеида в клетках *F. tularensis* близко к тому, что обнаруживается у других грамотрицательных бактерий». Также им приведены

следующие сведения по количественному составу ряда веществ, в %: общий азот — 11,0–12,45, общий фосфор — 1,58–1,75, редуцирующие вещества (на глюкозу) — 9,19–9,94, глюкозамин — 1,11–2,01, нуклеиновые кислоты (по фосфору) 16,27–18,03, белок — 61,54–50,72, нуклеопротеид — 68,75–77,81.

Морозова Т.П. с соавт. со ссылкой на работу Олсуфьева Н.Г. констатируют, что «в процессе эволюции он (туляреми́ный микроб) приспособился к существованию в организме теплокровных животных, где полностью удовлетворяет свои пищевые потребности» [13]. Они же, ссылаясь на работу Francis E., свидетельствуют, что «характерной особенностью возбудителя туляремии является высокая потребность в цистине и тиамине».

Еще в начале 1960-х годов диссертационными исследованиями Анциферова М.И. [1] было показано влияние концентрации аминного азота в питательной среде на рост туляреми́ного микроба. Им был сделан вывод: «При концентрации в среде 50 мг% аминного азота микроб не растет: с повышением содержания аминного азота до 150 мг% чувствительность среды возрастает; дальнейшее повышение концентрации аминного азота не улучшает ростовых качеств среды».

Установлена потребность туляреми́ного микроба в определенном наборе аминокислот: Arg, Cys, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Thr, Tyr, Val. Также выявлено, что

© 2017 г. Волох О.А., Комиссаров А.В., Биби́ков Д.Н., Холматов К.И., Авдеева Н.Г., Никифоров А.К.

* **Автор для переписки:**

Комиссаров Александр Владимирович,
д.б.н., зав. отделом экспериментальных фармацевтических форм
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

E-mail: rusrapi@microbe.ru

для размножения *F. tularensis* целесообразно присутствие в питательной среде витаминов В₅ и В₁, ионов магния [31]. При конструировании синтетической питательной среды для обеспечения максимального роста *F. tularensis* исследователями была показана необходимость присутствия в ней пантотената кальция, урацила, аденина и гуанина [31].

Лещенко А.А. с соавт. делает вывод, что для улучшения ростовых свойств питательной среды в ней необходимо присутствие стимуляторов роста *F. tularensis*, к которым они отнесли кровь или субстанции, приготовленные из нее [11], что согласуется с результатами других исследователей [26, 34].

Подавляющим числом исследователей делается вывод, что для полноценного развития туляремийного микроба ему требуется источник энергетического питания, в качестве которого используется, как правило, глюкоза [7, 8, 11, 12, 14, 17–19].

В монографии Павлова В.М., Дятлова И.А. [15] представлены современные данные молекулярно-генетических и биохимических особенностей разных подвидов туляремийного микроба. Отмечена, в частности, чувствительность к содержанию в среде ионов железа и ряда аминокислот.

Представленный выше анализ литературы по питательным потребностям туляремийного микроба выявил, что он достаточно строг к качественно-количественному составу компонентов, необходимых для его развития. В связи с этим для выращивания *F. tularensis* применяли и применяют, как правило, питательные среды, обладающие сложным составом. Подробная характеристика питательных сред, используемых в диагностике туляремийного микроба, представлена в Практическом руководстве по лабораторной диагностике [9] и монографии «Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций» [6].

Анализ биотехнологических особенностей культивирования туляремийного микроба

Целью настоящей работы является анализ биотехнологических особенностей культивирования *F. tularensis* для накопления биомассы и получения протективных антигенов. Культивирование туляремийного микроба осуществляют на плотных, полужидких и жидких питательных средах. Мы посчитали целесообразным рассмотреть особенности выращивания *F. tularensis* именно в такой последовательности.

Первые упоминания о технологических приемах культивирования *F. tularensis* относятся к 1940-м годам. Так, Гайским Н.А. получение вакцинной эмульсии осуществлялось на желточной среде Мак-Коя или цистиновом агаре при температуре 37 °С в течение 24–48 ч, после чего микробная биомасса смывалась физиологическим раствором и использовалась для получения вакцины. Необходимо отметить, что продуктивность указанного способа не превышала 3 млрд м.к. [5]. Авторским коллективом Всесоюзного научно-исследовательского института прикладной микробиологии разработана плотная питательная среда и предложены методические приемы культивирования туляремийного микроба [12]. Состав питательной среды был следующим: забуференный гидролизат рыбной кормовой муки, ферментализат черного альбумина, дрожжевой экстракт или смесь витаминов группы В, сернокислый магний, сернокислый натрий, цистеин, глюкоза, агар. Концентрация инокулята составляла 5×10⁶ кл/мл, выращивание осуществлялось при температуре 37 °С в течение 48 ч. Авторы на основе экспериментов по выращиванию *F. tularensis* 15 НИИЭГ задекларировали увеличение выхода биомассы при производстве диагностикумов в 1,5 раза в сравнении с известной питательной средой (в описании патента на изобретение не раскрыт состав «известной» среды).

Известна высокоэффективная среда (Т-среда), содержащая по 10 г/л сердечно-мозгового настоя, бактотриптона, дрожжевого экстракта, казаминовых кислот. Кроме того, в данную среду перед применением вносят раствор, содержащий сульфат магния, сульфат железа (II), хлорид калия, гидрофосфат калия, глюкозу, цистеин, цитрат натрия [16]. Такая среда используется в качестве среды накопления, поскольку обеспечивает увеличение количества бактерий до 10000 раз [9]. Последними исследованиями зарубежных авторов подтверждена эффективность жидкой питательной среды Т [8] для анализа образцов окружающей среды и клинических изолятов на присутствие возбудителя туляремии [21, 28]. Применение указанной среды при масштабировании технологии экономически нецелесообразно.

Исследованиями специалистов Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) доказана эффективность сертифицированного Ft-агара для культивирования и выделения *F. tularensis* при полевых испытаниях [13]. Показано успешное применение Ft-агара для выращивания музейных штаммов туляремийного микроба *F. tularensis* [13]. Данная среда является коммерческой и рекомендо-

вана для культивирования и выделения туляремийного микроба [9].

В российском патенте на изобретение 2333948 [11] описана питательная среда для выращивания возбудителя туляремии следующего состава, г/л: магний сернокислый — 0,5; натрий сернокислый — 0,7; железо сернокислое — 0,03; цистин — 0,5; тиамина хлорид — 0,005; глюкоза — 10,0; кислота никотиновая — 0,008; экстракт (автолизат) пекарских дрожжей — 3,5; агар-агар — 20; ферментативный гидролизат крови крупного рогатого скота, разведенный дистиллированной водой до содержания аминного азота 160–180 мг % — остальное. Авторы декларируют в качестве технического результата повышение скорости роста и эффективности питательной среды в отношении *F. tularensis*.

За пределами России для выращивания *F. tularensis* применяют плотные питательные среды с кровью. Наиболее известная из них — разработанный Francis E. шоколадный агар, в составе которого мясопептонный агар, цистин, глюкоза, соль и 5–10% дефибрированной кроличьей крови. В настоящее время является коммерческой питательной средой (Becton Dickinson, BD), широко используется для накопления чистой культуры туляремийного микроба [32, 34, 36]. Для выделения туляремийного микроба, согласно рекомендациям ВОЗ, применяется сердечно-цистиновый агар с 9% бараньей кровью, прогретый до лизиса эритроцитов (СНАВ) [20, 23, 33, 35, 37].

Среди очевидных недостатков использования плотных питательных сред для накопления биомассы туляремийного микроба можно выделить: практически полное отсутствие возможности управления процессом; «малый» выход биомассы; дороговизна плотных питательных сред; существенная возможность контаминации в ходе выращивания [7].

Более целесообразным, по крайней мере, для накопления туляремийного микроба, является его выращивание на полужидких и жидких средах. Первое упоминание об использовании жидкой питательной среды для выращивания туляремийного микроба датировано 1923 годом. Тогда Francis E. предложил сывороточно-глюкозо-цистиновый бульон [25]. Накопление биомассы происходило пленкой на поверхности среды, при этом если количество инокулята было менее чем 109 м.к./мл, то роста не наблюдалось. Применение сред с белковой основой (различных вариаций) приводило в ряде случаев при аэрировании культуральной жидкости в течение 24 ч к конечному выходу биомассы до 1010 м.к./мл [14].

Для приготовления туляремийного микроба с целью получения живой вакцины, по имеющимся у нас

данным, используется выращивание *F. tularensis* на полужидких средах в следующей композиции: гидролизаты свежей рыбы, печени или мяса — 20–30%, гидролизат желатина — 10%, желатин — 1,5%, хлористый натрий — 0,5%, глюкоза — 1%, цистин — 0,1%. рН культуральной жидкости составляет 7,2–7,3 [8]. Количество инокулята — 0,5–1,0 млрд м.к./мл. Снабжение микробной культуры кислородом осуществляется либо за счет подачи воздуха, либо за счет встряхивания. Констатируется, что конечная концентрация спустя 18–20 ч после проведения процесса составляет от 3,0 до 6,0 млрд м.к./мл.

Специалистами ГНЦ ПМБ предложена простая жидкая питательная среда (Д-бульон) для наработки биомассы туляремийного микроба с целью выделения ДНК и антигенов из бактериальных клеток, а также для культивирования трансформантов *F. tularensis* (состав приведен на 1 л): дрожжевой экстракт — 5 г; калия фосфат однозамещенный — 12 г; калия гидроксид — 3,9 г; натрий хлористый — 10 г; цистеина гидрохлорида моногидрат — 0,1 г; сульфат железа (II) 7-водного — 6 мг; глюкоза — 2 г; рН среды 7,2) [10].

В Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» для бифазного культивирования туляремийного микроба предложена модифицированная среда, содержащая панкреатический гидролизат рыбкопной муки 17,0 г/л, стимулятор роста гемофильных организмов 5,0 г/л, экстракт пекарских дрожжей 2,3 г/л, магния сульфат 0,5 г/л, натрия сульфит 0,7 г/л, L-цистеин 0,5 г/л. Авторами констатируется увеличение выхода биомассы (до 60%) по сравнению с культивированием на плотных и жидких средах [18].

При изучении биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии культивирование *F. tularensis* проводили в биореакторе с применением среды следующего качественного состава: сернокислый гидролизат рыбкопной муки, минеральные соли, витамины, цистин, глюкоза. Процесс проводили от 16 до 18 ч при температуре 37 °С [17].

В монографии Олсуфьева Н.Г. описана жидкая синтетическая среда, разработанная Traub R. et al., содержащая ряд аминокислот (Arg, Asp, Cys, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val), а также тиамин, спермин, минеральные соли, глюкозу. Культивирование туляремийного микроба осуществлялось с аэрацией. Продуктивность процесса составляла от 16 до 40 млрд м.к./мл [14].

В последние годы вырос интерес к проблеме питательных сред при культивировании туляремийного микроба. В частности, рассматриваются варианты опти-

мизации питательных сред на основе ВНИ и СНАВ [30, 33]. Активно проводятся исследования по влиянию среды культивирования на экспрессию антигенов и факторов вирулентности [27], иммуногенность вакцинного штамма [24], даже на эффективность вакцины [29].

Анализ доступной литературы также выявил практически полное отсутствие научных работ, посвященных разработке и исследованию процесса управляемого глубинного культивирования *F. tularensis*. Для последнего случая можно выделить цикл исследований Шепелева И.А. с соавт. по разработке процесса выращивания туляреминого микроба с целью получения протективных антигенов. Так, в результате выполнения эксперимента по культивированию *F. tularensis* 15 НИИЭГ в колбах на термостатируемой качалке с использованием ФТ-бульона были выявлены временные интервалы фаз развития туляреминого микроба. Авторами показано, что «Лаг-фаза длилась 8 ч. Экспоненциальная фаза продолжалась 16 ч. Стационарная фаза наступала спустя сутки от начала выращивания. Максимальное количество биомассы (10 млрд/мл) отмечено в 24-часовых пробах» [19]. При выращивании *F. tularensis* 15 НИИЭГ с применением ФТ-бульона в биореакторе вместимостью 10 дм³ были определены условия проведения технологического процесса, способствующие накоплению биомассы. Показано, что требуется ввод воздуха в культуральную среду в количестве 2,0...3,5 дм³/мин при частоте вращения мешалки 63 рад/с; оптимально поддержание рН культуральной среды в интервале 6,8...7,0. Также с целью поддержания требуемого значения рН выявлена необходимость введения в питательную среду дигидрофосфата калия из расчета 1,0 г на 1,0 дм³ среды выращивания. Кроме того, в ходе исследований выяснено, что введение глюкозо-витаминной (витамины В₁ и В₃) добавки в культуральную среду в начале экспоненциальной стадии развития микробной популяции позволяет увеличить концентрацию туляреминого микроба на 50% (до 18 млрд/мл). Авторами также исследована возможность применения отъемно-доливного метода культивирования *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Для этого исследователи в начале экспоненциальной стадии развития микробной популяции отбирали половину культуральной жидкости и вносили такое же количество питательной среды с глюкозо-витаминной добавкой. Пятикратное выполнение такой процедуры дало возможность увеличить количество биомассы [7, 18].

Авторским коллективом Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» разработана эффективная жидкая питательная среда, использование которой дает возможность при глубинном

культивировании вакцинного штамма туляреминого микроба получать высокие концентрации жизнеспособной биомассы с низкой степенью диссоциации, что актуально при производстве живых вакцин. В качестве питательной основы новой питательной среды использовали сухой ферментативный гидролизат фибрина, приготовленный из отхода производства антирабического иммуноглобулина, обладающий следующими характеристиками: содержание общего азота — 4,76±0,03%; аминного азота — 1,39±0,03%; процент расщепления белка — 50,7±1,7%; содержание пептона (по шкале Дифко) — 53,7±1,5%; следы непереваренного белка отсутствовали; сухой остаток — 8,78±0,2%; хлориды — 0,22±0,01%; влажность — 2,4±0,2%; рН — 6,9±0,2. Авторами выявлено, что применение питательной среды следующего состава: гидролизат фибрина — 5%; глюкоза — 1%; 0,005% пантотената кальция (витамин В₃); 0,5% хлорида натрия и цистеина; рН 7,2 при аппаратном культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ — в течение 20±2 ч позволило добиться концентрации микробных клеток 37±0,5 млрд м.к. в 1 мл среды при значениях коэффициента жизнеспособности — 68±0,5% и степени диссоциации — 97±1% SR (белых) иммунных колоний от общего количества выросших [2–4].

Заключение

Таким образом, при анализе данных литературы по основным методам и технологиям культивирования туляреминого микроба, а также влияния различных параметров на рост этого микроорганизма установлено следующее:

- для полноценного развития *F. tularensis* необходима достаточно сложная по качественно-количественному составу компонентов питательная среда, в состав которой должны входить аминокислоты, белки, пептоны, глюкоза, ряд минеральных солей, субстанции крови и витамины В₁ и В₃;
- основным источником энергетического питания туляреминого микроба является глюкоза;
- для выращивания штаммов-продуцентов *F. tularensis* в производстве вакцин используется, как правило, периодический способ культивирования;
- для полноценного развития туляреминого микроба при глубинном культивировании необходимо снабжение его достаточным количеством растворенного в культуральной жидкости кислорода;
- культивирование необходимо проводить при оптимальном значении рН (7,2±0,1) культуральной

жидкости, стабилизируя его добавлением в питательную среду фосфатного буфера, выполняющего функцию поддержания рН;

- оптимальной температурой для развития туляремийного микроба является 37 °С;
- наибольшая концентрация микроорганизмов наблюдается при достижении популяцией стационарной стадии развития.

Литература

1. *Анциферов М.И.* Сравнительная оценка питательных сред в бактериологической диагностике туляремии: автореф. дис. канд. биол. наук. — Иркутск, 1963. — 23 с.
2. *Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина И.И., Никифоров А.К.* Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба // Патент РФ 2518282. С12N 1/20. 2014.
3. *Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М., Холматов К.И., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К.* Жидкая питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба // Проблемы особо опасных инф. — 2017. — № 2. — С. 81–83.
4. *Волох О.А., Комиссаров А.В., Антонычева М.В., Лобовикова О.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина И.И., Миронова Н.П., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К.* Совершенствование технологии получения живой туляремийной вакцины // Проблемы особо опасных инф. — 2016. — № 3. — С. 81–84.
5. *Гайский Н.А.* Способ приготовления туляремийной вакцины // Авторское свидетельство СССР 66621. 30h, 6. 1946.
6. *Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В.* Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. — М.: ООО «ТиРу», 2012. — С. 208–227.
7. *Еремин С.А., Волох О.А., Шепелев И.А., Дальвадяц С.М., Дятлов И.А.* Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляремийного микробов // Проблемы особо опасных инф. — 2006. — Вып. 92. — С. 58–61.
8. *Колядицкая Л.С., Шмурыгина А.А.* Усовершенствование препарата сухой живой туляремийной вакцины // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 1957. — № 10. — С. 84–89.
9. *Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Онищенко Г.Г., акад. РАМН Кутырева В.В.* — М.: ЗАО «Шико», 2013. — С. 173–176.
10. *Лапин А.А., Павлов В.М., Домотенко Л.В., Храмов М.В., Мокриевич А.Н.* Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* // Проблемы особо опасных инф. — 2009. — Вып. 102. — С. 66–67.
11. *Лещенко А.А., Лазыкин А.Г., Кузнецов С.М., Поярко Ю.А., Филимонова Г.В., Роман В.В.* Питательная среда для выращивания возбудителя туляремии // Патент РФ 2333948, С12N 1/20. 2008.
12. *Логачева Л.В., Морозова Т.П., Кундин В.А., Дмитриева И.Ю., Артюхин В.И.* Питательная среда для культивирования *Francisella tularensis* // Авторское свидетельство СССР 1730143. С12N 1/20. 1992.
13. *Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Храмов М.В.* Оценка диагностических свойств прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремийного микроба (Ft-агара) // Проблемы особо опасных инф. — 2010. — Вып. 105. — С. 50–53.
14. *Олсуфьев Н.Г.* Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. — М.: Медицина, 1975. — 190 с.
15. *Павлов В.М., Дятлов И.А.* Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. — М.: ООО «ТиРу», 2012. — 267 с.
16. *Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н.* Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis* // Антибиотики и медицинская биотехнология. — 1987. — № 32(2). — С. 133–137.
17. *Хлебников В.С., Головлев И.Р., Кулевацкий Д.П., Аврин С.Ф., Пиширков С.Ю., Тохтамышева Н.В., Жемчугов В.Е., Сафонова Л.А., Герасимов В.Н., Чугунов А.М., Ветчинин С.С., Галактионов В.Г., Афанасьев С.С.* Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии // Мол. генет., микробиол. и вирусол. — 1991. — № 7. — С. 15–20.
18. *Шепелев И.А., Волох О.А., Еремин С.А., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М.* Способ получения биомассы туляремийного микроба // Патент РФ 2451743. С12N 1/20. 2012.
19. *Шепелев И.А., Дятлов И.А., Волох О.А., Авдеева Н.Г., Еремин С.А., Жемчугов В.Е.* Оценка биокинетических и морфометрических показателей роста туляремийного микроба в процессе оптимизации получения клеточной массы // Проблемы особо опасных инф. — 2003. — Вып. 85. — С. 157–163.
20. *Aloni-Grinstein R., Schuster O., Yitzhaki S., Aftalion M., Maoz S., Steinberger-Levy I., Ber R.* Isolation of *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* from blood cultures by plasma purification and immunomagnetic separation accelerates antibiotic susceptibility determination // Front Microbiol. — 2017. — № 8. — P. 312.
21. *Becker S., Lochau P., Jacob D., Heuner K., Grunow R.* Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria // J. Microbiol. Methods. — 2016. — № 121. — P. 5–7.
22. *Chamberlain R.E.* Evaluation of live tularemia vaccine prepared in chemical defined medium // Appl. Microbiol. — 1965. — № 13. — P. 232–235.

23. Edén J.S., Rose K., Ng J., Shi M., Wang Q., Sintchenko V., Holmes E.C. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in ringtail possums, Australia // *Emerg. Infect. Dis.* — 2017. № 23(7). — P. 1198-1201.
24. Faith S.A., Smith L.P., Swatland A.S., Reed D.S. Growth conditions and environmental factors impact aerosolization but not virulence of *Francisella tularensis* infection in mice // *Front. Cell Infect. Microbiol.* — 2012. — № 2. — P. 126.
25. Francis E. The amino-acid cistine in the cultivation of tularemia // *Public Health Reports.* — 1923. — № 38(3). — P. 324–327.
26. Gaspar A.J., Tresselt H.B., Ward M.K. New solid medium for enhanced growth of *Pasterella tularensis* // *J. Bacteriol.* — 1961. — № 82. — P. 564–569.
27. Holland K.M., Rosa S.J., Kristjansdottir K., Wolfgeher D., Frans B.J., Zarella T.M., Kumar S., Sunagar R., Singh A., Bakshi C.S., Namjoshi P., Barry E.M., Sellati N.J., Kron S.J., Gosselin E.J., Reed D.S., Yazzlet K.R.O. Differential growth of *Francisella tularensis*, which alters expression of virulence factors, dominant antigens, and surface-carbohydrate synthases, governs the apparent virulence of Ft SchuS4 to immunized animals // *Front. Microbiol.* — 2017. — № 8. — P. 1158.
28. Jacob D., Nattermann H. R., Kruger R., Becker S., Grunow R. Enhanced growth of *Francisella tularensis* in a liquid nutrient medium (medium T) / *The 6th Int. Conference on Tularemia.* — Berlin, 2009. — P.108.
29. Kumar S., Sunagar R., Pham G., Franz B.J., Rosa S.J., Hazlett K.R., Gosselin E.J. Differential cultivation of *Francisella tularensis* induces changes in the immune response to and protective efficacy of whole cell-based inactivated vaccines // *Front. Immunol.* — 2017. — № 7. — P. 677.
30. Morris B.J., Buse H.Y., Adcock N.J., Rice E.W. A novel broth medium for enhanced growth of *Francisella tularensis* // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2017. — № 64(6). — P. 394–400.
31. Nagle S.C., Jr., Anderson R.E., Gary N.D. Chemically defined medium for the growth of *Pasteurella tularensis* // *J. Bacteriol.* — 1960. — № 79. — P. 566–571.
32. Nikhiwale S.D., Gehlot C.S., Bandi A.K., Jasani A.N. Isolation of *Francisella tularensis* from blood culture // *Indian J. Med. Microbiol.* — 2015. — № 33(2). — P. 329–331.
33. Petersen J.M., Schriefer M.E., Gage K.L., Montenieri J.A., Carter L.G., Stanley M., Chu M.C. Methods for enhanced culture recovery of *Francisella tularensis* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — № 70. — P. 3733–3735.
34. Reary B.W., Klotz S.A. Enhancing recovery of *Francisella tularensis* from blood // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* — 1988. — № 11(2). — P. 117–119.
35. Simşek H, Taner M, Karadenizli A, Ertek M, Vahaboğlu H. Identification of *Francisella tularensis* by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2012. — № 31(9). — P. 2353–2357.
36. Treat J.R., Hess S.D., McGowan K.L., Yan A.C., Kovarik C.L. Ulceroglandular tularemia // *Pediatr. Dermatol.* — 2011. — № 28(3). — P. 318–320.
37. WHO Guidelines on Tularemia. World Health Organization. — Geneva, 2007. [Эл. ресурс]: <https://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf>.

METHODS AND TECHNOLOGIES OF CULTIVATION OF *TULAREMIUM* MICROBE

O.A. VOLOKH¹, A.V. KOMISSAROV¹, D.N. BIBIKOV¹, K.I. HOLMATOV¹,
N.G. AVDEEVA¹, A.K. NIKIFOROV^{1,2}

¹ Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»,

² N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

The review of Russian and foreign literature devoted to the cultivation of *Tularemia* microbe is presented. The data on the qualitative and quantitative composition of nutrient media used for the cultivation of *Francisella tularensis* are analyzed. The information on the following methods used in the technological process of cultivation of the *Tularemia* microbe is described: periodic cultivation, periodic with feed, detachable-topografting of microorganisms. Their advantages and disadvantages are considered. The influence of the following parameters is analyzed: the content of dissolved oxygen and the source of energy supply, the pH of the culture liquid, the temperature, the duration of cultivation for the reproduction of the *Tularemia* microbe. The conducted analysis of data, allowing to increase the efficiency and efficiency of the process of cultivation. *Francisella tularensis*, as well as analytical materials for the prevention and prevention of tularemia.

Keywords: cultivation, *Francisella tularensis*, nutrient media, technological parameters.

ГЕОИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ КАК ИНСТРУМЕНТ ИНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА В РАМКАХ ОБЕСПЕЧЕНИЯ МОНИТОРИНГА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

В.Д. КРУГЛИКОВ^{1*}, Д.А. ЛЕВЧЕНКО¹, И.В. АРХАНГЕЛЬСКАЯ¹, С.В. ТИТОВА¹,
Е.В. МОНАХОВА¹, А.С. ВОДОПЬЯНОВ¹, М.И. ЕЖОВА¹, А.Р. КВАСОВ²

¹ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора»,

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России»

Проанализированы возможности пополняемой базы данных геоинформационной системы «Холера 1989–2014». Она позволяет комплексно охарактеризовать фено- и генотипические свойства штаммов *V. cholerae* O1, O139 различной эпидзначимости, изолированных в процессе многолетних мониторинговых исследований объектов окружающей среды на территориях субъектов РФ с 1989 года по настоящее время. Это осуществляется с позиций пространственно-временных рисков и с учетом результатов углубленного молекулярно-биологического исследования нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 E1Toг доступным и экономичным методом ПЦР.

Ключевые слова: геоинформационные технологии, особо опасные инфекции, холера, мониторинг.

Геоинформационные системы (ГИС) применяются как при выполнении научных исследований и разработок, так и при проведении федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора, прежде всего, за инфекционными и паразитарными заболеваниями, а также особо опасными инфекциями (ООИ). Повышение эффективности ГИС-технологий, связанное с разработкой и внедрением новых информативных и доступных геоинформационных систем, в настоящий период является одной из приоритетных задач, решение которой напрямую связано с интенсификацией уровня научно-методического обеспечения и практической помощи при работе в плане оптимизации мониторинга особо опасных инфекций, включая холеру, на территории нашей страны [28, 39, 48].

Анализ данных литературы показал, что на современном этапе в качестве стандартного программного средства используются ГИСы, которые наилучшим образом подходят для сбора и обработки территориаль-

но распределенной информации в целях комплексного мониторинга и позволяют «привязать» любое явление к определенной местности [6, 16, 36, 43].

Говоря о хронологии, следует отметить, что начиная с 1990-х годов ГИСы используют в здравоохранении разных стран мира. Геоинформационные системы связаны с системой управления мероприятиями ВОЗ в случаях чрезвычайных ситуаций, имеющих международное значение. Этот управляемый в электронном формате инструмент служит ориентиром для принятия решений в отношении предупреждения вспышек инфекций и реагирования на них путем объединения информации, поставляемой системами раннего предупреждения, оценки рисков и оперативных ответных мероприятий. Так, географические и климатические условия, ассоциируемые с прежними вспышками паразитарных и инфекционных болезней, могут определить на картах районы наибольшего риска их возникновения и распространения, а также реагирования путем объединения информации, поставляемой системами раннего предупреждения, оценки рисков и оперативных ответных мероприятий [35]. В 2008 году в практику работы референс-центра по мониторингу за малярией, лейшманиозом и филяриозом на базе Научно-исследовательского института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова была внедрена база данных (БД) по социально значимым паразитозам в России. В последующем Л.Ф.

© 2017 г. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Титова С.В., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Ежова М.И., Квасов А.Р.

* Автор для переписки:

Кругликов Владимир Дмитриевич
доктор мед. наук, заведующий лабораторией микробиологии холеры, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: kruglikov_vd@antiplague.ru

Морозовой (2014) была модифицирована программа HealthMapper, используемая в качестве инструмента прогнозирования возможных эпидемических последствий завоза малярии и инвазивных комаров на территорию Российской Федерации. Разработанная программа дала возможность проведения оперативного анализа результатов мониторинга эпидемиологической ситуации по социально значимым паразитарным болезням в РФ.

Современный уровень развития информационных технологий позволил создавать и хранить документы в электронной форме. Ранее был разработан электронный паспорт природного очага чумы, который включал в себя самую разнообразную информацию об очаге. При этом особой ценностью такого паспорта являлась возможность уточнения, редактирования и неограниченного пополнения информации [24]. Была создана интегрированная количественная оценка результатов обследования природных очагов чумы, подтверждена надежность действующих методов выявления эпизоотий различного ранга. Кроме того, была предложена в практику система оценок эффективности профилактических мероприятий по степени воздействия на отдельные компоненты эпидемического потенциала, а также на степень снижения риска заражения человека [17]. В качестве программной оболочки была внедрена ГИС на платформе ArcGIS. Важными особенностями ГИС-технологий являлись точное определение географических координат всех пунктов эпизоотического обследования с помощью спутниковых навигаторов и создание пользовательских карт [38]. Паспортизация природных очагов чумы РФ строилась также на основе ГИС-технологий. Основными ее направлениями были: тематическое геоинформационное картографирование и создание соответствующей БД [41, 42].

Для научно-методического обеспечения мониторинга сибирской язвы на территории Республики Казахстан была разработана ГИС и создана БД стационарно неблагополучных по сибирской язве населенных пунктов. Кроме того, проведена дифференциация территории Казахстана по степени риска заражения возбудителем сибирской язвы [30]. В ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» была составлена БД «Сибирская язва. Зона затопления ложа водохранилища Богучанской ГЭС», включающая в себя ландшафтно-географические, почвенные, эпизоотолого-эпидемиологические и лабораторно-исследовательские слои для информационно-аналитической систематизации на платформе ArcGIS [18]. В ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» с использованием ГИС-технологий был разработан кадастр стационарно неблагополучных

по сибирской язве пунктов в Краснодарском крае. Кроме того, был проведен пространственный сопряженный анализ экологической приуроченности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов к почвенным и ландшафтным зонам Краснодарского края [1, 2, 5]. В ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» создана ГИС, которая предоставляет возможность выявлять закономерности распространения сибирской язвы людей и животных, проводить сравнительно-исторический анализ данных, отслеживать динамику и тенденцию заболеваемости, анализировать распределение стационарно неблагополучных пунктов по типам почв, видам ландшафтов и др. [12, 13]. Группой авторов была разработана методика риск-ориентированной оценки потенциальной опасности территории Ростовской области по сибирской язве на основе пространственного анализа, не зависящего от административного деления территории, которая дает более точные результаты, чем районирование по административным территориям [7]. На основе создания электронной БД «Коллекция штаммов туляремийного микроба» была разработана и зарегистрирована ГИС «Туляремия» (2006 г.), содержащая информацию по генотипированию 352 исследованных штаммов возбудителя, источникам, времени, местам их выделения и представляющая собой современную систему динамического слежения за эпидемическим процессом [9, 10].

Учитывая особенности клинических признаков заболевания населения конго-крымской геморрагической лихорадкой на фоне глобального потепления климата с помощью ГИС-технологий специалистами Казахстана была разработана ландшафтно-эпидемиологическая карта Южно-Казахстанской области [4].

С применением современных ГИС-технологий был проведен сравнительный анализ заболеваемости жителей города Иркутска тремя нозологическими единицами, подлежащими обязательной регистрации, — клещевым энцефалитом, иксодовым клещевым боррелиозом, клещевым риккетсиозом, и впервые определены участки высокого риска заражения, имеющие точную географическую привязку благодаря разработанному алгоритму обработки текущей эпидемиологической информации [32].

Современное информационно-аналитическое обеспечение мониторинга ООИ на территории РФ напрямую касается такой инфекции, как холера, которая имеет свои тенденции и особенности на современном этапе развития седьмой пандемии. Так, обработка и систематизация результатов мониторинговых исследований на холеру во время седьмой пандемии холеры включали в себя несколько этапов.

Первым из этих этапов явилось создание «Справочника-кадастра», содержащего данные о длительности и сезонности обнаружения, а также о фенотипических свойствах штаммов холерных вибрионов Эль Тор, выделенных в течение 19-летнего периода из различных экосистем на территории бывшего СССР [31]. В «Справочнике-кадастре» впервые были проанализированы итоги бактериологических исследований на наличие холерных вибрионов Эль Тор в воде объектах окружающей среды (ООС) и сточных водах с 1970 по 1988 гг. на 100 административных территориях (13 союзных республик без областного деления, автономных республик, краев, областей, городов союзного и республиканского подчинения), охватывающих все климато-географические области умеренного и субтропического поясов страны. Представлены результаты о выделении *V. cholerae* El Tor из проб воды: 388 рек и ручьев, 392 оросительных каналов и арыков, 266 озер, прудов и водохранилищ, 56 артезианских скважин, искусственных водоемов, плавательных бассейнов, 6 морей, а также из сточных вод 138 населенных пунктов. Из пресноводных водоемов было выделено 17818 штаммов, из морской воды — 884, из сточных вод — 4734 [31, 40].

На втором этапе в качестве продолжения комплексных исследований, представленных ранее в виде «Справочника-кадастра», в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» была разработана БД ГИС «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации в 2005–2008 годах», с помощью которой появилась возможность в электронном формате анализировать фенотипические свойства и эпидзначимость, а также распространение в ООС штаммов *V. cholerae* O1, O139 и Р-варианта по административным территориям России [15]. С использованием указанной ГИС были проанализированы сведения о 151 штамме холерных вибрионов, выделенных из ООС за многолетний период, из которых 142 штамма Эль Тор и 9 штаммов O139. Холерные вибрионы были выявлены из 32 рек и ручьев (119 штаммов), из 4 озер, 3 прудов (24 штамма) и 2 заливов (5 штаммов), сточных вод трех населенных пунктов (14 штаммов) на 15 административных территориях [14]. По нашему мнению, результаты внедрения в практику «Справочника-кадастра» и БД послужили основой последующего этапа, связанного с созданием и применением ГИС-технологий в научно-практическом обеспечении повышения эффективности мониторинговых исследований на холеру.

При создании любой системы типирования возбудителей инфекций важным моментом является создание

штаммовой базы данных, содержащей информацию о месте, времени, источнике выделения штамма, его характеристиках. Кроме того, целенаправленное накопление, обработка и обобщение информации, связь с географической средой обитания позволяют в полном объеме оценить эпидемиологическую ситуацию, что способствует принятию необходимого управленческого решения на различных уровнях: от местного до федерального [6].

В помощь программам профилактики и борьбы с холерой Х. J. Li et al. (2012) [49] создана БД ГИС, проведены анализ управления программой и демонстрация ее функций для мониторинга пространственного аспекта холеры. Вместе с тем авторами осуществлялись сбор данных о выделении культур холерных вибрионов из морепродуктов, регистрация случаев острых кишечных инфекций (ОКИ), связанных с *V. cholerae* O1ElTor, получение информации о состоянии окружающей среды и климатических условий. Полученные сведения были введены в БД ГИС для проведения пространственного анализа. В результате стали более понятны динамика заболеваемости холерой, ее сезонные характеристики и изменение во времени. Для прогнозирования заболеваемости холерой была собрана информация о «горячих точках» и о территориальной приуроченности эпидемий.

Применение программных средств оказало помощь и позволило моделировать пространственно-временные риски холеры, а также правильно запланировать объем профилактических и противоэпидемических мероприятий по борьбе с этим заболеванием. Данные об использовании ГИС для проведения эпидемиологической диагностики на популяционном и биоценотическом уровнях с разработкой эпидемиолого-географических карт распространения 7-й пандемии холеры в мире и в Украине, а также с отражением динамика вовлечения стран мира в эпидемический процесс были представлены в работе Кирьяковой Л.С. с соавторами (2004).

На основе ГИС были разработаны эпидемиолого-географические карты распространения 7-й пандемии холеры в мире и в Украине, а также показана динамика вовлечения стран мира в эпидемический процесс холеры [23].

Следует отметить, что на основе использования таких информационных технологий, как проблемно-ориентированные БД и ГИС, в работе референс-центра по мониторингу холеры осуществляется ежегодная оценка эпидемиологической обстановки по холере на глобальном и других территориальных уровнях. Так, в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» существует ряд различных БД: «Холера Эль Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в

СНГ»; «Штаммы *Vibrio cholerae*»; «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации в 2005–2008 годах»; «Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп, циркулирующие в Ростовской области», «Холера штаммы VNTR» и др. [3, 8, 11, 15, 19, 37]. Вместе с тем была разработана интегративная «онлайн» ГИС, содержащая информацию о VNTR-генотипах штаммов *V. cholerae* O1, доступная на веб-сайте ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» для широкого круга специалистов. Это позволило искать и отображать VNTR-генотипы на электронных картах различного масштаба для эпидемиологического анализа и установления связей между штаммами холерных вибрионов, выделенных в различных регионах РФ. Данная ГИС как инструмент (программного продукта) включает в себя возможности сбора, хранения, анализа графической визуализации пространственных (географических) данных и позволяет пользователям проводить поиск, анализ и редактирование как цифровой карты местности, так и дополнительной информации об интересующих ООС [3, 46].

Представляет интерес тот факт, что ГИС-технологии дают возможность проведения биоинформационного анализа в аспекте многолетних данных о циркуляции в водных ООС штаммов *V. cholerae* O1, O139, а также холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, что имеет важное значение для своевременного определения направленности и объема профилактических мероприятий на каждой конкретной административной территории [3, 11].

В ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора» была разработана БД «*Vibrio cholerae* eltor. Сибирь и Дальний Восток» (2012 г.) и создана ГИС «Географическая информационная система *Vibrio cholerae* O1 и O139, г. Иркутск» (2015 г.). Кроме того, на основе определения амплификационного профиля по ряду генетических детерминант (*ctxAB*, *tcpA*, *tnp0183*, *pro0490*, *hlyA*, *rtxA*, *rtxC*, *mshA*, *mshQ*, *hapA*, *vspR*) была зарегистрирована БД «*Vibrio cholerae* Сибирь и Дальний Восток-амплификационный профиль_MLVA-генотипов» (2016) [33, 34].

При оценке результатов мониторинга холерных вибрионов в ООС, сравнивая разные популяции нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, применяют различные молекулярно-биологические методы изучения с разной дискриминирующей силой [25–27, 44, 45, 47]. Однако в литературе нет данных о наличии универсального метода установления генотипов нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из ООС.

Следовательно, разработанные в настоящее время ГИС по проблеме «Холера», востребованы и разноплановые. Они отражают доступную информацию на глобальном и территориальном уровнях. В них учитываются региональные особенности выделения штаммов *Vibrio cholerae* различного происхождения и эпидзначимости; они основываются на разнообразных методических подходах, характеризующих изолированные штаммы (VNTR-типирование, ПЦР-типирование и т.д.). Кроме того, они расширяют ранее опубликованные исследования по анализу результатов мониторинга холерных вибрионов в ООС на территории России.

По результатам проведенных многолетних мониторинговых исследований на наличие холерных вибрионов в субъектах РФ сотрудниками ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» была создана авторская пополняемая БД ГИС «Холера 1989–2014» [22] с ретроспективной и перспективной направленностью. ГИС содержит информацию о 1158 штаммах холерных вибрионов, изолированных из ООС на территории субъектов России, а именно: дата выделения штаммов; наименование административной территории и ООС, из которого были изолированы культуры; №№ штаммов при поступлении и присвоенные в референс-центре по мониторингу холеры; фенотипические свойства (агглютинабельность холерными сыворотками, серотип; чувствительность к фагам эльтор, классический; принадлежность к фаготипу, чувствительность к полимиксину В, результаты реакции Фогес – Проскауэра, гемолитическая активность), а также генотипические свойства – данные расширенного ПЦР-генотипирования по детекции 39 генетических детерминант факторов патогенности. Такая БД, созданная в виде компьютерной программы, позволила проводить анализ распространения в ООС *V. cholerae* O1, O139 и Р-вариант, учитывая пространственную и временную характеристики штаммов (то есть динамику обнаружения); определять сходства и различия штаммов по введенным заданным параметрам фенотипических и расширенных генетических свойств (то есть давать микробиологическую характеристику штаммам). ГИС «Холера 1989–2014», интегрированная в геоинформационный портал ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт», доступная специалистам Роспотребнадзора (http://gis.antiplague.ru/s_cholera-genes.php), дает возможность устанавливать принадлежность того или иного штамма к определенному генотипу (на момент исследования) на основе разработанного методического подхода ПЦР-генотипирования штаммов холерных вибрионов различного происхождения по 14 генам [20, 21, 29].

Результаты ПЦР-генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов по 14 генам могут быть сопоставлены с результатами других молекулярно-биологических методов (VNTR-типирование, INDEL-типирование и др.) с перспективой совершенствования предложенного метода с участием других противочумных учреждений.

Таким образом, пополняемая БД ГИС «Холера 1989–2014» позволяет комплексно охарактеризовать фено- и генотипические свойства штаммов *V. cholerae* O1, O139 различной эпидзначимости, изолированных в процессе многолетних мониторинговых исследований ООС на территориях субъектов РФ с 1989 года по настоящее время, с позиций пространственно-временных рисков и с учетом результатов углубленного молекулярно-биологического исследования нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 ЕПТог доступным и экономичным методом ПЦР. Это имеет важное значение как дополнительный подход с высокой разрешающей способностью в оперативном установлении происхождения (занос/переживание) и в изучении персистентного потенциала в плане оптимизации методологии по актуализации этих штаммов.

Литература

1. Антюганов С.Н., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Ерошенко Е.И., Цыганкова О.И., Мезенцев В.М., Аксенова Л.Ю., Лысогора С.В., Джаилиди Г.А. Сибирская язва в Ставропольском крае // Медицинский вестник Северного Кавказа. — 2012. — Т. 28. — № 4. — С. 67–70.
2. Антюганов С.Н. Совершенствование эпидемиологического надзора за сибирской язвой с использованием ГИС-технологий на административных территориях Северо-Кавказского федерального округа: Автореф. дис. ... канд. мед. наук по специальности: 14.02.02. — Ставрополь, 2014. — 23 с.
3. Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Кругликов В.Д., Зубкова Д.А., Ежова М.И. Свидетельство № 2015620331. Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп, циркулирующие в Ростовской области, 2015.
4. Байтанаева А.О., Атмабар Б.Б., Рахимов К.Р., Кулемин М.В., Тажеков М., Садуллаева Д. Экологические особенности заболеваемости Конго-Крымской геморрагической лихорадкой и применение ГИС-технологий для ее изучения в Южном Казахстане // Наука и мир. — 2014. — № 8(12). — С. 157–162.
5. Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Рязанова А.Г., Плужникова О.В., Еременко Е.И., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Использование ГИС-технологий при разработке кадастра стационарного неблагополучных по сибирской язве пунктов в Краснодарском крае // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2014. — № 2. — С. 59–64.
6. Васильева О.В., Москвитина С.И., Савельев В.Н., Бабеншиев Б.В. Создание информационной системы «Холера на Кавказе» // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2. — № 1–2. — С. 126.
7. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. ГИС «Холера-интернет» — использование современных интернет-технологий в эпидемиологической практике // ЗНиСО. — 2016. — № 12. — С. 36–39.
8. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Свидетельство № 2007620389. Холера. Штаммы VNTR, 2007.
9. Водопьянов А.С., Павлович Н.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н. Свидетельство № 2006620302. Геоинформационная система «Туляремия», 2006.
10. Водопьянов А.С. Генетическое разнообразие *Francisella tularensis*: VNTR-анализ: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07. — Ростов-на-Дону, 2009. — 197 с.
11. Водопьянов С.О., Полеева М.В., Телесманич Н.Р., Водопьянов А.С., В.В. Агафонова В.В. Ретроспективный анализ культур *Vibrio cholerae* nonO1/non O139, выделенных от людей на территории Республики Узбекистан с 1987 по 1990гг., с помощью ГИС «Холера-Штаммы-VNTR» // Мед. вестник Юга России. — 2013. — № 2(12). — С. 44–48.
12. Водяницкая С.Ю., Водопьянов А.С., Киреев Ю.Г., Водопьянов С.О., Судына Л.В., Логвин Ф.В. О совершенствовании эпидемиологического надзора за сибирской язвой в Ростовской области на основе новых компьютерных технологий // Мед. вестник Юга России. — 2016. — № 2. — С. 42–46.
13. Водяницкая С.Ю., Водопьянов А.С., Киреев Ю.Г., Водопьянов С.О. Свидетельство № 2015620562. Сибирская язва. Ростовская область, 2015.
14. Голубев Б.П., Кругликов В.Д., Авдеева Е.П., Шестиалтынова И.С., Часовских С.В., Монахова Е.В., Смоликова Л.М., Н.Н. Ускова Н.Н., Чемисова О.С., Кудрякова Т.А. ГИС «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации в 2005–2008 гг.» / В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат-лы. пробл. комиссии. — Ростов-на-Дону, 2010. — № 23. — С. 35–40.
15. Голубев Б.П., Кругликов В.Д., Кудрякова Т.А., Часовских С.В., Монахова Е.В. Свидетельство № 2010620040. Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации в 2005–2008 годах, 2010.
16. Дубянский В.М., Куличенко А.Н., Семенко О.В., Малецкая О.В., Мезенцев В.М. Совершенствование эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями с использованием геоинформационных систем // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. — 2014. — № 1. — С. 85–91.
17. Дубянский В.М. Концепция использования ГИС-технологий и дистанционного зондирования в эпиднадзоре

- за чумой // Врач и инфекционные технологии. — 2012. — № 2. — С. 42–46.
18. Дугаржапова З.Ф. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой на территории строительства крупных промышленных объектов с использованием ГИС-технологий / З.Ф. Дугаржапова, А.В. Родзиковский, М.В. Чеснокова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2010. — № 17. — С. 216–219.
 19. Ежова М.И., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Монахова Е.В. Свидетельство № 2012620979. Штаммы *Vibrio cholerae*, 2012.
 20. Зубкова Д.А., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Непомнящая Н.Б. Использование новой ГИС для ретроспективного и оперативного анализа свойств холерных вибрионов O1, выделенных из объектов окружающей среды на территории России // Холера и патоген. для чел-ка вибрионы. Матер.сообщ. спец-ов Роспотребнадзора. — Ростов-на-Дону, 2014. — №27. — С. 47–50.
 21. Зубкова Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Применение современных информационных технологий для эпидемиологического анализа распространения возбудителей особо опасных инфекций // Актуал. пробл. диагностики инф. забол. (микробиол., биотехнол., эпидемиол., паразитол.): Сб. науч.-практ. работ. Межрегион. науч.-практ. конф. — Ростов-на-Дону, 2015. — С. 56–59.
 22. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055. Геоинформационная система. Холера 1989–2014, 2014.
 23. Кирьякова Л.С., Хайтович А.Б., Коваленко И.С., Дулицкий А.И. Использование географических информационных технологий в эпидемиологической диагностике особо опасных инфекций // Пробл. особо опасных инф. — 2004. — № 1(87). — С. 24–28.
 24. Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н. Перспективы ГИС — паспортизации природных очагов чумы Российской Федерации // Пробл. особо опасных инф. — 2012. — № 1(111). — С. 48–53.
 25. Кульшань Т.А. Анализ молекулярно-генетических особенностей штаммов *Vibrio cholerae* классического и Эль Тор биоваров: Автореф. дисс. ... канд. мед.наук: 03.02.03. — Саратов, 2013. — 12 с.
 26. Кульшань Т.А. Генетическое разнообразие клинических штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации // Современные технологии обеспечения биологической безопасности III научно-практическая школа-конференция молодых ученых и специалистов: материалы конференции. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. — Оболensk, 2011. — С. 104–106.
 27. Кульшань Т.А., Агафонов Д.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Особенности геномов штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с разной эпидемиологической значимостью // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены. Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. — 2015. — С. 150–151.
 28. Кутырев В.В. Противочумная система Российской Федерации в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия // Здравоохранение РФ. — 2013. — № 2. — С. 24–28.
 29. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Титова С.В., Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И. ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2016. — № 6. — С. 19–25.
 30. Лухнова Л.Ю., Айкимбаев А.М., Садовская В.П., Позылов С.К., Мека-Мечеченко Т.В., Некрасова Л.Е., Сармантаева А.Б. Использование ГИС технологий для составления базы данных очагов сибирской язвы в Казахстане // Дезинфекция. Антисептика. — 2011. — № 6. — С. 42–49.
 31. Мединский Г.М., Наркевич М.И., Ломов Ю.М., Пинигин А.Ф., Голубев Б.П., Алексеенко В.В., Левчишина Г.И., Кюрегян А.А. Справочник-кадастр распространения вибрионов Эль-Тор в поверхностных водоемах и сточных водах на территории СССР во время 7-й пандемии холеры. — Ростов-на-Дону, 1991. — 172 с.
 32. Мельникова О.В., Лесных С.И., Андаев Е.И. Применение ГИС-технологий для анализа заболеваемости трансмиссивными клещевыми инфекциями (на примере города Иркутска) // ЗНиСО. — 2014. — № 12. — С. 43–45.
 33. Миронова Л.В. Свидетельство № 2012620754. *Vibrio cholerae* eltor. Сибирь и Дальний Восток, 2012.
 34. Миронова Л.В. Свидетельство № 2015620466. Географическая информационная система *Vibrio cholerae* O1 и O139, г. Иркутск, 2015.
 35. Морозова Л.Ф. Применение географических информационных систем в здравоохранении // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2014. — № 3. — С. 46–51.
 36. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванова С.М., Анисимова Г.Б. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005–2014 г. Прогноз на 2015 г. // Пробл. особо опасных инф. — 2015. — № 1. — С. 18–25.
 37. Москвитина Э.А., Анисимова Г.Б., Беспалов И.А. Свидетельство № 2003620048. Холера Эль Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ, 2003.
 38. Ниязбеков Н.Ш., Абделиев З.Ж., Сагиев З.А., Матжанова А.М., Абдразакова А., Айсауытов Б., Балибаев М., Токсанбаева С., Аймаханов Б.К., Куптлеуова Л.Б.,

- Акмамбетова К.У. Регрессивный анализ и ГИС-методы при оценке эпизоотической активности природных очагов чумы Казахстана // Бюллетень Вост.-Сиб. науч. центра Сибирского отделения РАМН. — 2014. — № 2(96). — С. 77–82.
39. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Мельникова А.А. О мерах по совершенствованию эпидемиологического надзора в части индикации возбудителей инфекционных заболеваний // Эпидемиол. и инфекц. бол. Актуал. вопр. — 2013. — № 2. — С. 4–13.
40. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии // Вестник РАМН. — 2015. — Т. 70. — № 2. — С. 249–256.
41. Поршаков А.М., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Князева Т.В. Совершенствование эпизоотологического мониторинга природных очагов чумы в режиме ГИС-паспортизации / В кн.: Мат.-лы. XII Межгос. науч.-практ. конф. — М., 2014. — С. 163–165.
42. Поршаков А.М., Кузнецов А.А. ГИС-картографирование и паспортизация природных очагов чумы Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. — 2012. — № 1–2. — С. 183.
43. Савельев С.И., Щукин И.А., Ходякова И.А. Внедрение Геоинформационных технологий в систему эпидемиологического надзора за холерой / В кн.: Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения действий на чрезвычайные ситуации. — 2012. — С. 203–205.
44. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Краснов Я.М. MLVA-типирование клинических штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры // Мол. генет., микробиол. и вирусол. — 2015. — Т. 33. — № 1. — С. 15–22.
45. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период // Микробиология. — 2010. — № 3. — С. 3–10.
46. Соловьев М.Ю., Ковалев Е.В., Слись С.С., Ненадская С.А., Конченко А.В., Леоненко Н.В., Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Пичурина Н.Л. Взаимодействие Управления Роспотребнадзора по Ростовской области с ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора по эпидемиологическому надзору за холерой в 2015 году / В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы Российской научной конференции. — Ростов-на-Дону, 2016. — № 29. — С. 34–37.
47. Шашкова А.В., Кульшань Т.А., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Молекулярно-генетический анализ и изучение генетического родства измененных вариантов холерного вибриона биовара Эль Тор, выделенных в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2. — № 1–2. — С. 344–345.
48. http://rosпотреbnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=7531.
49. Li X.J., Fang L.Q., Wang D.C., Wang L.X., Li Y.P., Li Y.L., Yang H., Kan B., Cao W.C. Design and implementation of Geographical Information System on prevention and control of cholera // Zhonghua Liu Xing Bin Xue Za Zhi. — 2012. — Vol. 33(4). — P. 431–434.

GEOINFORMATION TECHNOLOGIES AS A TOOL OF INFORMATION ANALYSIS IN THE FRAMEWORK OF MONITORING OF INFECTIOUS DISEASES, INCLUDING ESPECIALLY DANGEROUS INFECTIONS IN THE TERRITORY OF RUSSIA

V.D. KRUGLIKOV¹, D.A. LEVCHENKO¹, I.V. ARKHANGELSKAYA¹, S.V. TITOVA¹,
E.V. MONAKHOVA¹, A.S. VODOPYANOV¹, M.I. EZHOVA¹, A.R. KVASOV²

¹ Rostov on Don Antiplague Institute,

² Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia

The possibilities of the replenished database of the geoinformation system «Cholera 1989–2014» are analyzed. It allows to characterize phenotypic and genotypic properties of *V. cholerae* O1, O139 strains of different significance, isolated in the process of multi-year monitoring of environmental objects in the territories of subjects of the Russian Federation from 1989 to the present. This is carried out from the perspective of space-time risks and taking into account the results of an in-depth molecular biological study of nontoxigenic strains of *V. cholerae* O1 ElTor by an affordable and cost-effective PCR method.

Keywords: geoinformation technologies, especially dangerous infections, cholera, monitoring.

1. Рукописи статей и других материалов представляются в редакцию на бумажном носителе (формат А4) или в электронном виде (на дискете или по электронной почте с обязательным уведомлением).
2. Текст набирается в Microsoft Word, шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — полуторный. Размещение на листе формата А4 со стандартными полями. Кроме текста статьи, добавляются сведения об авторе (ах): Ф.И.О., место работы, должность, научные степень и звание, адреса для переписки и электронной связи, номера факсов и телефонов). Необходимо сопроводительное письмо из учреждения.
3. Объем рукописи: оригинальные статьи — не более 12–14 стр. (в среднем 22000 знаков), не более 25 цитированных авторов; обзоры — не более 20–24 стр. (в среднем 40000 знаков), список литературы — не более 50 авторов. Требования к композиции рукописи: 1) оригинальные статьи — УДК, название, автор (ы), место работы, резюме на русском и английском языках, ключевые слова, введение, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение (выводы), литература, список сокращений; 2) краткие сообщения и обзоры строятся в виде сплошного текста, без вышеуказанных рубрикаций, со списком литературы, резюме на русском и английском языках; 3) остальные материалы (письма в редакцию, хроникальные сообщения, рецензии и т.д.) представляются в произвольной форме.
4. Требования к оформлению содержания рукописи (таблицы, графики, формулы, фотографии, рисунки и др.). Рисунки прилагаются отдельно к тексту рукописи в бумажном и электронном виде в формате TIF или JPEG. Таблицы помещаются по ходу текста или прилагаются отдельно. Порядок оформления иллюстративного и иного дополнительного (пояснений, примечаний, благодарностей и т.д.) материала к текстам обычный.
5. Требования к цитированной литературе: Список литературы оформляется или в алфавитном порядке (вначале — литература на русском языке, затем — на иностранных), или по порядку упоминания и ссылок в тексте при использовании цифр. В последнем случае номер цитированного источника берется в тексте в квадратные скобки. Оформление отдельного источника литературы осуществляется в соответствии с общепринятыми

для научных изданий библиографическими требованиями, включая международные правила.

6. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
7. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
8. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
9. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном материале авторов.
10. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
11. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
12. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
13. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (www.biorosinfo.ru).



Подписано к печати 30.09.17
Формат 60/90¹/₈. Бумага офсетная № 1.
Печать офсетная. Гарнитура Академия.
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: biosphere@biorosinfo.ru

ОБЩЕСТВО БИОТЕХНОЛОГОВ РОССИИ ИМ. Ю.А. ОВЧИННИКОВА

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (ОБР) создано в 2003 г., зарегистрировано Минюстом России.

Главными целями деятельности ОБР являются:

- содействие развитию биотехнологии в России как приоритетного направления научно-технического прогресса, основы повышения уровня жизни и благосостояния ее граждан;
- содействие сохранению научного и научно-технологического потенциала биотехнологии в различных отраслях народного хозяйства, достижению приоритета российской науки;
- обеспечение обмена научными идеями и научно-техническими достижениями, передовым производственным опытом;
- содействие развитию сотрудничества ученых, инженеров, специалистов с мировым научным и общественно-политическим сообществом;
- создание условий для творческой работы, роста профессионализма и компетентности, более полного использования интеллектуального потенциала членов организации в интересах развития науки и производства.

Для достижения этих целей ОБР осуществляет различные мероприятия, в том числе проводит конференции, симпозиумы, рабочие совещания. Регулярно проводится Съезд Общества биотехнологов России.

Издается журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова» совместно с Информационно-аналитическим центром медико-социальных проблем.

ОБР имеет отделения в 57 регионах России и объединяет свыше 3000 членов.

ОБР является членом Европейской федерации биотехнологии.

ОБР тесно сотрудничает с Союзом биотехнологов и другими общественными и государственными организациями, научными и образовательными учреждениями по профилю.

Основой организационной деятельности ОБР являются региональные отделения, тесно взаимодействующие с Центральным Правлением и Секциями (экспертными группами).

Членство в ОБР является бесплатным для физических лиц.

Контакты: Адрес: 119071 Москва, Ленинский пр-т, 33

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: obr@biorosinfo.ru; www.biorosinfo.ru