

УДК @@@

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКИХ ШТАММОВ *STACHYBOTRYS CHARTARUM*

© 2004 г. С. Н. Еланский^{*1}, Я. В. Петрунина^{**}, О. И. Лаврова^{**}, А. Н. Лихачев^{**}

^{*}ВНИИ Фитопатологии РАСХН, Б. Вяземы

^{**}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 03.12.02 г.

В работе проведен сравнительный анализ штаммов *Stachybotrys chartarum*, выделенных с техногенных целлюлозосодержащих материалов и с природных субстратов географически удаленных регионов России. Определяли размеры спор, токсичность (тест на *Paramecium caudatum*) и устойчивость к фунгицидам “Беномил”, “Олилен” и “Тилт”, а также был проведен ПЦР – анализ структуры генома с помощью праймера, комплиментарного коровой последовательности ретропозона SINE. Установлено, что в выборках из удаленных регионов и с разных субстратов встречаются штаммы, различающиеся по уровню токсичности, устойчивости к фунгицидам и структуре генома. Исследование с помощью ПЦР не выявило связи между структурой генома, группами исследованных признаков и приуроченностью штаммов к территориям или субстратам. Выявленные различия в проявлении комплекса исследованных признаков у групп штаммов из удаленных местообитаний, а также наличие разных типов вегетативной совместимости свидетельствуют о внутривидовом разнообразии *S. chartarum* в удаленных частях ареала. Отсутствие специфических фено- или генотипических признаков у штаммов, выделенных с разных субстратов, позволяет говорить о том, что заселение искусственных субстратов происходит, по-видимому, случайными штаммами из природных местообитаний. Популяции на техногенных субстратах представляют собой популяционные волны, не имеющие собственной эволюционной судьбы.

Ключевые слова: *Stachybotrys chartarum*, биоповреждения, микотоксины, устойчивость к фунгицидам, анализ популяций грибов.

Stachybotrys chartarum (Ehrenb. ex Link) Hughes – сапротрофный микромицет, в естественных условиях обитающий в почве и на растительных остатках, предпочитая мертвые стебли, листья и семена злаков [1]. Способен вызывать заболевания растений: описаны корневая гниль сои [2], поражения волокон и нераскрывшихся коробочек хлопчатника, стеблей сахарного тростника и фруктовых деревьев [3]. В антропогенной среде грибок переходит на целлюлозосодержащие техногенные субстраты: бумагу, картон, обои, некоторые строительные смеси, деревянные и фанерные конструкции и т.д.

Практическая значимость гриба обусловлена тем, что *S. chartarum* синтезирует токсины, оказывающие сильное действие на организм человека и животных: роридин E, сатратоксины F, G, H, триховееролы, триховееррины, веррукарин, веррукарин J. Присутствие токсинов отмечено во всех морфологических структурах гриба и в культуральной жидкости. Помимо токсинов грибок способен производить иммуносупрессоры (например, циклоспорин) [4, 5] и летучие органические

соединения (1-бутанол, 3-метил-2-бутанол, 3-метил-1-бутанол и тайопсен) [6].

Особую опасность представляет массовое развитие гриба на целлюлозосодержащих техногенных субстратах в помещениях (обои, гипсокартон, некоторые шпаклевки и т.д.) после сильных подтоплений. Например, в середине 1990-х гг. были отмечены массовые расстройства здоровья и даже гибель людей в старых зданиях Кливленда, США после наводнения. Причиной этого явилось массовое развитие *S. chartarum* на нижних этажах зданий [4]. Присутствие спор и газообразных стахиботриотоксинов в системах кондиционирования высотных зданий также способно вызвать массовое поражение людей. Неоднократно отмечалась связь между жалобами людей на плохое самочувствие, связанными с качеством воздуха помещений (Indoor Air Quality) и ростом *S. chartarum* [7, 8].

В популяциях *S. chartarum* выявлены штаммы, различающиеся гемолитической активностью, содержанием токсинов и структурой генома [9]. Наши исследования [1.10] показали, что штаммы различаются скоростью роста как на питательных средах, так и на образцах техногенных материалов.

¹ Адресат для корреспонденции (e-mail: elansky@yahoo.com)

Таблица 1. Количество выделенных в чистую культуру изолятов с учетом места выделения и субстрата

Место выделения	Субстрат	Кодировка	Число изолятов	Всего выделено
Москва и Московская обл.	Штукатурка	МШ	6	22
	Бумага (картон)	МБ	10	
	Растительные остатки	МРО	2	
	Ткань	МТ	2	
	Воздух	МВ	1	
	Неизвестно	МН	1	
Томск и пригород	Бумага (картон)	ТБ	12	23
	Растительные остатки	ТРО	5	
	Воздух	ТВ	2	
	Экскременты таракана	ТТ	3	
	Штукатурка	ТШ	1	
Республика Карачаево-Черкессия	Почва	КП	4	4
Республика Бурятия	Почва	БП	4	4
Тверская обл.	Растительные остатки	ТРО	1	1
Все регионы				54

Целью настоящей работы было выявление вероятных взаимосвязей между приуроченностью штаммов к субстратам, их географическим происхождением и комплексом признаков, включающим морфометрические параметры, токсичность, устойчивость к фунгицидам и структуру генома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы 54 штамма *Stachybotrys chartarum* из географически удаленных регионов России: Московская (далее – МО), Томская (далее – ТО), Тверская обл., республики Бурятия и Карачаево-Черкессия. Штаммы выделены из образцов почвы, с растительных остатков и с различных техногенных материалов (табл. 1). Выделение проводили стандартными микробиологическими методами с использованием влажных камер и селективных сред [11, 12]. Все штаммы протестированы на устойчивость к трем фунгицидам (“Беномил”, “Олилен”, “Тилт”) и на токсичность по отношению к *Paramecium caudatum* Ehrh. Для исследования генома были отобраны 32 изолята из разных местообитаний.

Для определения размеров спор культуры гриба инкубировали в течение 10 сут на агаризованной среде на основе пивного суслу. Измеряли длину и ширину 100 спор для каждого изолята. Достоверность сравнения признаков оценивали с помощью программного пакета SPSS 11.5 (независимый Т-тест). Выборки считали достоверно различными в случае, если величина критерия $T < 0.05$.

Для определения токсичности изолятов использовали культуральную жидкость изолятов гриба, выращенных на жидкой среде на основе пивного суслу в течении 10 сут. В качестве тест объекта использовали *Paramecium caudatum*, которую выращивали на питательной среде (200 мл воды, 10 зерен овса; настаивается несколько сут). На предметное стекло наносили две капли культуральной жидкости и одну каплю жидкости с парамециями (все капли – по 50 мкл). Предметные стекла помещали во влажные камеры. Наблюдения за поведением парамеций проводили через 5, 20, 40, 60 мин. Время гибели парамеции служило критерием токсичности культуральной жидкости. Гибель констатировали по полному прекращению движения и распаду простейших [11]. Штамм гриба считали резкотоксичным, если через 5 мин более 70% парамеций были мертвы, токсичным – если гибель отмечалась через 20 мин, слаботоксичным – через 40 мин, нетоксичным – если он не вызывал гибели или каких-либо морфологических изменений у большинства парамеций через 1 ч.

Для исследования чувствительности к фунгицидам после предварительной проверки фунгицидного действия ряда препаратов [10] были отобраны 3, отличающиеся высокой активностью против *S. chartarum* и показывающими значительную разницу между чувствительными и устойчивыми изолятами: “Олилен” – системный фунгицид широкого спектра действия против болезней зерновых, “ТИЛТ” – системный фунгицид защитного и лечащего действия, эффективный против грибов,

относящихся к аскомицетам, базидиомицетам, а также против несовершенных грибов [13] и “Бенонил” – системный фунгицид защитного и лечащего действия против мучнистой росы, фузариоза, церкоспороза [14]. Чувствительность изолятов *S. chartarum* к фунгицидам оценивали по скорости радиального роста колонии на среде с фунгицидом и без него, как описано в [15]. Изолят считали чувствительным (S), если относительная скорость роста его колонии на среде с фунгицидом (при концентрации действующего вещества 10 мкг/мл) в сравнении с ростом на среде без фунгицида была менее 0.1; слабоустойчивым (SR) – при относительной скорости роста от 0.1 до 0.4; и устойчивым – более 0.4. Тест проводили в 3 повторностях для каждого изолята при оптимальной для роста гриба температуре 25°C [1]. Для оценки достоверности получаемых результатов проводили дополнительный тест по скорости роста на среде с концентрацией фунгицида 1 мкг/мл.

Мицелий для выделения ДНК наращивался в жидкой среде на основе пивного сусла. Через 14 сут инкубации при 25°C мицелий отцеживали из среды, промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на сложенную в несколько слоев фильтровальную бумагу для сушки. Около 0.5 мл подсушенного мицелия переносили в предварительно замороженную ступку, заливали жидким азотом и растирали. Растиранный мицелий (примерно 0.25 мл) переносили в микропробирку, добавляли 800 мкл. СТАВ-буфера (трис, pH 8.0 – 100 mM; NaCl – 1.4 M; ЭДТА, pH 8.0 – 20 mM; СТАВ solid – 2% (вос/об)), все перемешивали на вортексе, после чего помещали в водяную баню на 1 ч при 65°C. Каждые 20 мин перемешивали на вортексе. Затем добавляли 500 мкл. хлороформа и центрифугировали 10 мин. 700 мкл супернатанта переносили в новую чистую микропробирку, добавляли 400 мкл изопропанола и 1/10 объема CH_3COOK (5 M, pH 4.6), перемешивали вручную и центрифугировали 10 мин. Далее сливали супернатант и добавляли 200 мкл охлажденного 70% этанола, центрифугировали 5 мин, сливали спирт, удаляли его остатки фильтровальной бумагой и высушивали осадок. ДНК ресуспендировали в 50 мкл ТЕ-буфера. Для проведения ПЦР использовали 2 мкл.

Реакционная смесь для проведения ПЦР (объемом 20 мкл содержала 10 mM трис-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 0.01% Tween 20; по 100 мкМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP (“Silex”, Россия); 2 мкМ праймера; 5 mM MgCl_2 ; 20 нг ДНК и 0.1 ед. *Taq*-полимеразы (“Silex”, Россия). Программа, используемая в термоциклере (в работе использовался термоциклер Biometra T1, Германия): стадия 1, 1 цикл, 94°C 180 с., стадия 2, 30 циклов: шаг 1 – 94°C 40 с, шаг 2 – 49°C 40 с, шаг 3 – 72°C 90 с; стадия 3, 1 цикл, 72°C 300 с. Продукты реакции (около 20 мкл из реакционной смеси) разделяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле в трис-боратном буфе-

ре (0.1 M трис, 0.1 M борной кислоты, 0.025 M ЭДТА, pH 8.3). В гель предварительно добавляли бромистый этидий в концентрации 1 мкг/мл. Электрофорез проводили в режиме 7 В/см. В качестве маркеров для идентификации фрагментов использовали 1 kb DNA ladder (“Sibenzime”, Россия). Для реакции использовали 24 нуклеотидный праймер RevSine (5'-GGCATCAGTGAAGACCAAGCTAGGG-3'), комплиментарный части А-В бокса ретропозона SINE [16,17]. Сравнительный анализ штаммов вели по 14 четко разделяющимся полосам размером от 0.2 до 0.75 kb. Кластерный анализ проводился с помощью программного пакета Treecon.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование культурально-морфологических признаков изучаемых штаммов показало, что большинство из них не отличается от приводимых в определителях [3, 18, 19] для вида *S. chartarum* (atra). Средняя длина спор (7.36 мкм) была несколько меньше приведенной в определителе [19] – 8–11 мкм, однако средняя ширина спор (5.56 мкм) попадала в приведенный интервал (5–10 мкм, табл. 2). Средняя длина спор штаммов, собранных в МО, варьировала от 5.4 до 8.6 мкм, ширина – от 3.9 до 6.7 мкм, в ТО – длина от 5.6 до 9.2 мкм, ширина – от 4.3 до 7.6 мкм. Среди штаммов, выделенных с бумаги: средняя длина спор выделенных в МО изолятов варьировала от 6.1 до 7.5 мкм, ширина – от 4.6 до 5.9 мкм, в ТО – длина от 6.1 до 9.2 мкм, ширина – от 4.6 до 7.6 мкм. Статистический анализ не показал различий между суммарными выборками из МО и ТО ни по длине ($T = 0.052$), ни по ширине ($T = 0.15$), ни по отношению длины к ширине ($T = 0.39$). Анализ групп штаммов, выделенных с бумаги в МО и ТО, показал достоверные различия между ними по длине ($T = 0.01$), и отсутствие различий по ширине ($T = 0.08$). Размеры выборок других групп штаммов оказались слишком малы для их статистического анализа.

Сравнение изолятов по скорости роста их колоний на агаризованном сусло-агаре также выявило высокую межштаммовую изменчивость. Средняя скорость роста для групп штаммов из МО и ТО отличалась несущественно (табл. 2). Статистический анализ не показал различий между группами штаммов по скорости роста ($T = 0.98$ и $T = 0.5$ соответственно). Довольно большая часть штаммов (от 22 до 60% из разных групп, табл. 2) образовывала сектора при росте на агаризованном сусло-агаре.

Сравнительный анализ токсичности показал сильные различия в исследуемых группах штаммов по этому признаку (табл. 2). В выборках из МО и ТО преобладали токсичные изоляты, однако если в МО на втором месте стояла группа слабotoксичных, то в ТО наблюдается очевидный сдвиг в сторону резко токсичных. В Бурятии пре-

Таблица 2. Сравнительный анализ групп штаммов из географически удаленных популяций

Группа штаммов, место выделения	Число протестированных изолятов, шт	Доля изолятов с секторами, %	Скорость роста, мм/сут	Размер спор, мкм		Токсичность, %				Устойчивость к фунгицидам, %					
						НТ ²	СТ	Т	РТ	“Олилен”			“Тилт”		
				длина	ширина					S ³	SR	R	S	SR	R
МО ¹	22	33	1.94	6.9	5.4	14	24	48	14	30	60	10	32	42	26
ТО	23	27	1.96	7.5	5.7	10	10	50	30	48	43	9	14	62	24
Бурятия	4	50	2.06	8.4	6.1	0	75	25	0	67	0	33	67	0	33
Карачаево-Черкессия	4	25	1.17	7.1	5.2	0	25	75	0	50	25	25	0	100	0
МО, бумага	10	22	1.96	6.6	5.3	0	0	78	22	43	57	0	37	50	13
МО, штукатурка	6	33	2.17	6.9	5.1	0	49	34	17	0	83	17	20	20	60
ТО, растительные остатки	5	60	2.22	7.9	5.8	0	20	60	20	60	40	0	0	60	40
ТО, бумага	12	17	2.03	7.6	6	22	0	33	45	27	64	9	9	73	18
Среднее		33.38	1.94	7.36	5.58	5.75	25.38	50.37	18.5	40.63	46.5	12.87	22.38	50.87	26.75

¹ МО – Московская обл., ТО – Томская обл.

² НТ – не токсичен, СТ – слабо токсичен, Т – токсичен, РТ – резко токсичен.

³ S – чувствителен, SR – слабоустойчив, R – устойчив.

Таблица 3. Дистанции Роджерса между некоторыми сравниваемыми группами штаммов

Сравниваемые популяции	$R_{\text{ток}}^*$	Устойчивость к фунгицидам		$R_{\text{ср}}$, среднее
		$R_{\text{ол}}$	$R_{\text{тилт}}$	
МО–ТО	0.2	0.25	0.27	0.24
МО, бумага–ТО, бумага	0.55	0.2	0.36	0.37
МО, бумага–МО, штукатурка	0.66	0.53	0.58	0.59
ТО, бумага ТО, растительные остатки	0.47	0.42	0.27	0.39

Примечание. $R = [\Sigma(p_i - q_i)^2]^{1/2}$, где p_i и q_i – частоты i -го аллеля по данному локусу в сравниваемых популяциях, $R_{\text{ток}}$ – сравнение по уровням токсичности штаммов, $R_{\text{ол}}$ и $R_{\text{тилт}}$ – по уровням устойчивости к фунгицидам “Олилен” и “Тилт” соответственно, $R_{\text{ср}} = (R_{\text{ток}} + R_{\text{ол}} + R_{\text{тилт}})/3$ – среднее значение.

обладали слаботоксичные, в Карачаево-Черкессии – токсичные, нетоксичных и резкотоксичных изолятов в этих регионах не обнаружено. Штаммы, выделенные с бумаги в МО и ТО, также различались по токсичности: выделенные в МО были представлены токсичными и резкотоксичными, выделенные в ТО – также токсичными и резкотоксичными, но наряду с ними отмечались и нетоксичные штаммы. Группы изолятов, выделенных в МО со штукатурки и в ТО с растительных остатков, были представлены слаботоксичными, токсичными и резкотоксичными изолятами.

Сравнение по устойчивости к фунгицидам показало, что максимальным фунгицидным эффектом в отношении *S. chartarum* из проверенных пестицидов обладал “Беномил”. Отмечен только один устойчивый к нему изолят в МО. Уровни устойчивости к фунгицидам “Олилен” и “Тилт” у исследованных штаммов сильно различались. Почти во всех исследованных региональных группах штаммов было отмечено наличие изолятов с разными уровнями устойчивости к этим фунгицидам (табл. 2).

Сравнение групп штаммов с помощью дистанций Роджерса (табл. 3) показало слабые отличия

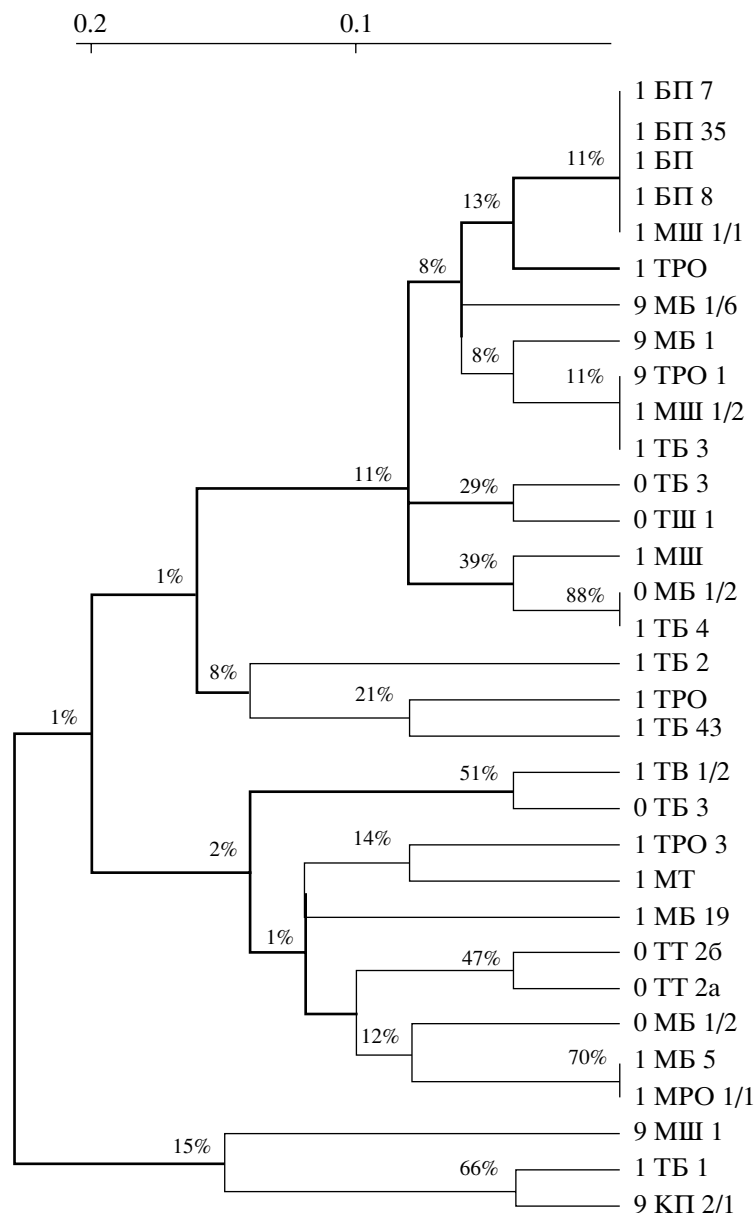


Рис. 1. Кластерная диаграмма штаммов *S. chartarum*, построенная на основании результатов ПЦР-анализа с праймером RevSine.

между суммарными выборками из МО и ТО. Более сильные отличия отмечены между группами штаммов выделенными в этих регионах с бумаги и между группами из одного региона, но с разных субстратов (МО, бумага – МО, штукатурка, ТО бумага – ТО, растительные остатки). Однако нельзя исключить, что различия между этими группами объясняются малым числом исследованных изолятов.

Анализ генома проводился с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймера RevSine. ПЦР-продукт на фореже был представлен большим числом полос. Для сравнительно-

го анализа использованы 14 четко разделяющихся полос размером от 0.2 до 0.75 kb. Анализ генома всей выборки изолятов выявил различия между сравниваемыми штаммами (рисунок). В отдельную группу выделились три штамма: 9 КП 2/1, 1ТБ1 и 9МШ1. Последний изолят, сильно выделяющийся из общей выборки, был единственным штаммом, устойчивым к фунгициду “Беномил”. Остальные штаммы разделились на 3 группы. Две из них, достаточно большие, объединяли штаммы из разных регионов и с разных субстратов, в третью попали три изолята из Томска – два с бумаги и один с растительных остатков. В це-

лом, исследование структуры генома с помощью праймера RevSine не выявило связи между структурой генома, токсичностью, устойчивостью к фунгицидам и приуроченностью штаммов к территориям или субстратам. Возможно, для более детального анализа штаммов и популяций из удаленных регионов и с разных субстратов необходим поиск других, более информативных маркерных признаков.

ОБСУЖДЕНИЕ.

Исследование комплекса признаков у штаммов *S. chartarum* показало, что в выборках из удаленных регионов и с разных субстратов встречаются изоляты, различающиеся по уровню токсичности, по устойчивости к фунгицидам и по структуре генома. Особый интерес представляют различия в степени устойчивости к фунгицидам, так как непосредственно против *S. chartarum* фунгицидные препараты не применяют. Одно из возможных объяснений различий в уровнях устойчивости – попадание фунгицидов на почвообитающие штаммы под сельскохозяйственными посевами при их обработке пестицидами. Это подтверждается и работой [20] в которой показано, что *S. chartarum* – один из распространенных видов микромицетов под посевами зерновых. Различия в уровнях токсичности, видимо, присущи штаммам изначально. Выявленные различия в проявлении комплекса исследованных признаков у групп штаммов из удаленных местообитаний, а также наличие разных типов вегетативной совместимости штаммов [10], свидетельствуют о внутривидовом разнообразии *S. chartarum* в удаленных частях ареала. Отсутствие специфических фено- или генотипических признаков у штаммов, выделенных с разных субстратов, позволяет говорить о том, что заселение искусственных субстратов происходит, по-видимому, случайными штаммами из природных местообитаний. Популяции на техногенных субстратах представляют собой популяционные волны, не имеющие собственной эволюционной судьбы. Благодарности.

Авторы благодарны В.П. Апрышко за помощь в работе, Ю.А. Чикину и М.В. Согонову за предоставленные для тестирования изоляты. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 00-04-48750).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elansky S.N., Petrunina Ya.V., Likhachev A.N. Growth of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) Hughes strains on natural and artificial substrates // Botanica Lithuanica. 2003 (in press).
2. Li S., Hartman GL, Jarvis BB, Tak H. A *Stachybotrys chartarum* isolate from soybean // Mycopathologia (UK). 2002. V. 154. P. 41–49.
3. Билай В.И., Пидопличко Н.М. Токсинообразующие микроскопические грибы // Киев. Наукова думка, 1970. 289 с.
4. Nelsson B. *Stachybotrys chartarum*: the toxic indoor mold // <http://www.APSnet.org>. 1999.
5. Likhachev A.N., Elansky S.N. *Stachybotrys* – black mold killing people // <http://www.shortway.to/toxin>. 2002.
6. Gao P., Martin J. Volatile metabolites produced by three strains of *Stachybotrys chartarum* cultivated on rice and gypsum board // Appl Occup Environ Hyg. 2002. V. 17. P. 430–436.
7. Page E.H., Trout D.B. The role of *Stachybotrys* mycotoxins in building-related illness // AIHAJ. 2001. V. 62. P. 644–648.
8. Cooley J.D., Wong W.C., Jumper C.A., Straus D.C. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome // Occup. Environ. Med. 1998. V. 55. P. 579–584.
9. Vesper S.J., Dearborn D.G., Yike I., Sorenson W.G., Haugland R.A. Hemolysis, toxicity, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Stachybotrys chartarum* strains // App. Environmen. Microbiol. 1999. P. 3175–3181.
10. Апрышко В.П., Лихачев А.Н., Еланский С.Н. Биология и культурально-морфологические признаки российских штаммов *Stachybotrys chartarum* // Докл. ТСХА. 2001. Вып. 273. С. 215–221.
11. Методы экспериментальной микологии. Справочник / Под редакцией Билай В.И. Киев. Наукова думка, 1982. 550 с.
12. Чумаков А.К., Минкевич И.И., Власов Ю.И., Гаврилова А.Е. Основные методы фитопатологических исследований. М. Колос, 1974. 250 с.
13. Гольшин Н.М. Фунгициды в сельском хозяйстве. М.: Колос, 1982. 271 с.
14. Кравцов А.А., Долгова А.В. Химические и биологические средства защиты растений. М.: Агропромиздат, 1989. 175 с.
15. Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozlovsky B., Kozlovskaya I., Russo P., Smart C., Fry W. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow region, Siberia and Far East // J. Phytopathology. 2001. V. 149. P. 605–611.
16. Лаврова О.И., Дьяков Ю.Т. Использование последовательности SINE как молекулярного маркера у *Phytophthora infestans* // Первая всероссийская конференция по иммунитету растений к болезням и вредителям. Науч. матер. Санкт-Петербург. 2002. С. 99–100.
17. Lavrova O., Kramerov D., Dyakov Y. Short interspersed elements as a molecular marker for *Phytophthora infestans* intraspecies differentiation // GILB'02 conference "Late blight: managing the global threat". Abstracts. Hamburg. 2002. P. 25.
18. Jong S.C., Davis E.E. Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture // Mycotaxon, V. 111. P. 409–485.
19. Ellis M.B. Dematiaceous hyphomycetes // Commonwealth Mycol. Inst. Kew. 1971. 608 p.

20. *Фролова Л.О., Свистунова И.Д., Горячих А.С.* Видовая структура комплекса микромицетов чернозема под различными фитоценозами // Междунар. симп. “Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов Европы” Сб. матер. Пенза. 2001. С. 14–147.