



РАЗВИТИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ, БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Тезисы докладов

IV Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием, посвящённой 45-летию
кафедры физико-химической биологии,
биоинженерии и биоинформатики ИГУ

Иркутск, 25–27 октября 2023 г.

ISBN 978-5-9624-2199-5

Публикуется по решению ученого совета биолого-почвенного факультета ИГУ

Редакционная коллегия:

В. П. Саловарова, М. В. Протопопова, А. А. Приставка

Развитие физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики на современном этапе : тезисы докладов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 45-летию кафедры физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики ИГУ. Иркутск, 25–27 октября 2023 г. / редкол.: В. П. Саловарова, М. В. Протопопова, А. А. Приставка. – Иркутск : Издательство ИГУ, 2023. – 1 электронный оптический диск (CD-ROM). – Заглавие с этикетки диска.

<https://doi.org/10.26516/978-5-9624-2199-5.2023.1-266>

ISBN 978-5-9624-2199-5

Доклады посвящены обсуждению актуальных проблем физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики.

Предназначено для преподавателей высших учебных заведений, научных сотрудников, аспирантов, студентов магистратуры и бакалавриата, интересующихся новейшими экспериментальными технологиями, биоинформационными методами и их применением на практике.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Иркутский государственный университет»

664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1; тел. +7 (3952) 51-19-00

Издательство ИГУ, 664082, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124

тел. +7 (3952) 52-18-53; e-mail: izdat@lawinstitut.ru

Подписано к использованию 24.10.2023. Тираж 13 экз. Объем 10,4 Мб.

Тип компьютера, процессор, частота:	32-разрядный процессор, 1 ГГц или выше
Оперативная память (RAM):	256 МБ
Необходимо на винчестере:	320 МБ
Операционные системы:	ОС Microsoft® Windows® XP, 7, 8 или 8.1. ОС Mac OS X
Видеосистема:	Разрешение экрана 1024x768
Акустическая система:	Не требуется
Дополнительное оборудование:	Не требуется
Дополнительные программные средства:	Adobe Reader 6 или выше



**РАЗВИТИЕ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ,
БИОИНЖЕНЕРИИ
И БИОИНФОРМАТИКИ
НА СОВРЕМЕННОМ
ЭТАПЕ**

Тезисы докладов
IV Всероссийской
научно-практической конференции
с международным участием,
посвящённой 45-летию
кафедры физико-химической
биологии, биоинженерии
и биоинформатики ИГУ

ISBN 978-5-9624-2199-5

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Иркутский государственный университет»
биолого-почвенный факультет



РАЗВИТИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ, БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Тезисы докладов

IV Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием, посвящённой 45-летию
кафедры физико-химической биологии,
биоинженерии и биоинформатики ИГУ

Иркутск, 25–27 октября 2023 г.

ISBN 978-5-9624-2199-5

СОДЕРЖАНИЕ

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

Беловежц Л. А., Малков Ю. А., Белоусов Д. С., Самульцев Д. О. Микробная трансформация древесных опилок: от лабораторных опытов до промышленного производства.....	12
Букин Ю. С., Бережной М. Д., Перетолчина Т. Е., Щербаков Д. Ю. Моделирование процессов адаптивной радиации в букетах близкородственных видов	15
Зилов Е. А., Русановская О. О., Шимараева С. В. Экологический мониторинг планктона озера Байкал за 80 лет: от пробоотбора до нейросетей	18
Клименков И. В., Судаков Н. П. Одорант-зависимая пластичность обонятельных клеток	21
Протопопова М. В., Павличенко В. В., Санданов Д. В. Происхождение <i>Fritillaria somnikovae</i> (Liliaceae) в Южной Сибири по данным молекулярно-генетического анализа.....	24
Рихтер В. А., Кулигина Е. В., Коваль О. А., Кочнева Г. В. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact – от разработки до клинических исследований.....	26
Синьков В. В., Кондратов И. Г., Огарков О. Б., Жданова С. Н., Носков А. П., Хромова П. А., Орлова Е. А., Рычкова Л. В., Колесникова Л. И. Онлайн-сервис для интерпретации результатов при прогнозировании устойчивости к бедаквилину по молекулярно-биологическим данным	27
Хрусталева Л. И., Кудрявцева Н. А., Ермолаев А. С. Ландшафт комбинаций у растений: новый взгляд на контроль локализации кроссинговера	28

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Becerril Aragon G. A., Garcia Contreras R. Antitumor-Effectors Delivery to Brain by Polymersomes	32
García Contreras R. Bacteriophage Applications Beyond Phage Therapy.....	36
Арефьева Н. А., Букин Ю. С., Эрдынеев С. В. Исследование процессов рекомбинации в области CRISPR-Cas локусов в геномах <i>Salmonella enterica</i> Subsp. <i>Enterica</i> Serovar Typhimurium при помощи методов биоинформатики	37
Бадалян И. А., Антонец Н. Г., Трусов И. С., Гринев В. В., Гончаров А. Е. Разработка лентивирусной векторной системы для эктопической экспрессии и презентации меланомного антигена MLANA в дендритных клетках человека	39

Баладин Д. Е., Арбатский М. С., Чуров А. В. Роль компонентов сурфактома внеклеточных везикул в распознавании их клеткой-мишенью.....	42
Басалова Н. А., Григорьева О. А., Дьячкова У. Д., Виговский М. А., Кулебякина М. А., Арбатский М. С., Ефименко А. Ю. Выявление потенциальных маркеров популяции профибротических активированных стромальных клеток с помощью секвенирования единичных клеток	44
Бединская В. В., Степаненко Л. А., Симонова Е. В., Злобин В. И. Анализ структур CRISPR/Cas систем в полногеномных последовательностях <i>Pseudomonas aeruginosa</i> как основа создания персонифицированной фаготерапии.....	46
Белик А. А., Семейкина Л. М., Персиянова Е. В., Белов Ю. А., Крылова Н. В., Щелканов М. Ю. Уникальные мутации и региональные отличия вируса SARS-CoV-2 в Приморском крае в 2020–2023 годах	48
Белькова Н. Л., Клименко Е. С., Немченко У. М., Григорова Е. В., Ситникова К. О., Зугеева Р. Е., Смурова Н. Е., Чемезова Н. Н., Савилов Е. Д. Биологические свойства и генетипирование клинических изолятов комплекса видов <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
Бердичевский Г. М., Васина Л. В. Конъюгаты наноламазов с цитостатиками (доксорубин и диоксидет). биологическая активность	53
Борисенко А. Ю., Арефьева Н. А., Джоиев Ю. П., Эрдынеев С. В., Букин Ю. С., Тетерина Г. А., Антипин Д. Е., Карноухова О. Г., Саловарова В. П., Злобин В. И. Биоинформационный алгоритм поиска и анализа разнообразия структур CRISPR-Cas систем в геномах <i>Salmonella enterica spp</i> и интерферируемых ими фагов.....	56
Вадаева И. В., Мокшин Е. В., Ревин В. В. Перспективные гемостатики нового поколения	59
Германова М. А., Риккинен А. Д., Сидорова Н. А. Идентификация и перспективы использования для целей экспресс-диагностики условно-патогенных энтеробактерий, выделенных из организма <i>Parasalmo mykiss</i> Walbaum (Salmonidae).....	62
Гринев В. В., Ильюшенок И. Н., Гузова Е. В., Трусков И. С., Су-чек В. А. Идентификация неоантигенов лейкозных клеток человека, пригодных для разработки дендритно-клеточных противолейкозных вакцин	65
Джоиев Ю. П., Арефьева Н. А., Борисенко А. Ю., Эрдынеев С. В., Мирошниченко Л. А., Букин Ю. С., Карноухова О. Г., Тетерина Г. А., Саловарова В. П., Малов С. И., Злобин В. И. Медико-биологические проблемы борьбы с инфекциями, вызываемых <i>Salmonella enterica spp</i> и перспективы их таргетной фаговой терапии на основе «омикс» и CRISPR/Cas технологии	68
Дымова М. А., Шнайдер Т. А., Четкина С. А., Петров Г. О., Малышева Д. О., Дроков Д. В., Агеенко А. Б., Васильева Н. С., Рихтер В. А., Кулигина Е. В. Эффективность онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении 3D-культур клеток глиобластомы человека U-87 MG	71

Заворотнюк Д. С., Сорокин А. А., Бормотов Д. С., Елиферов В. А., Пеков С. И., Бочаров К. В., Попов И. А. Определение оптимальных параметров предварительной обработки данных масс-спектрометрии с прямой ионизацией	72
Ильющёнок И. Н., Яцков Н. Н., Смолякова Е. В., Трусов И. С., Шинкевич Я. В., Скакун В. В., Гринев В. В. Комплексный биоинформатический пайплайн по идентификации и аннотации сайтов однонуклеотидного полиморфизма в геноме клеток человека, основанный на языке программирования R и Bioconductor.....	74
Колесникова В. Ю., Рар В. А., Ляпунов А. В., Епихина Т. И., Тикунов А. Ю., Тимошкин А. Б., Сидорова Е. А., Никитин А. Я., Андаев Е. И. Особенности инфицированности <i>Borrelia</i> spp. подвидов <i>Ixodes pavlovskiyi</i> в зонах симпатрии с <i>Ixodes persulcatus</i>	77
Kolodkin A. N. Live Data and 3 Layers of Emergence in Systems Biological Model of Epidemics: Lessons from COVID-19 and Preparation for the Next.....	81
Корженевская М. А., Розенфельд С. В., Того Е. Ф., Семенов К. Н., Шаройко В. В. Влияние наноформ препаратов C60-L-аргинина и диоксадегта на частоту аномальных головок сперматозоидов и хромосомных aberrаций у беспородных мышей	83
Кулигина Е. В., Васильева Н. С., Агеенко А. Б., Рихтер В. А. Фармакологическая эффективность онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении опухолевых моделей глиом	85
Куркутова П. М., Плотникова Ю. К., Пономарева О. А., Юринова Г. В., Приставка А. А. Иологические маркеры вирусного гепатита С.....	86
Маркова Ю. А., Беловежец Л. А., Мориц А. С. Фенотипическая резистентность бактерий к биологически активным соединениям (на примере <i>Rhodococcus qingshengii</i> VKM Ac-2784D)	89
Рекославская Н. И., Столбиков А. С. Модель изолированных легких из мышей для изучения иммуногенной и онколитической активности вирусных белков, антител и терапевтиков при создании терапевтической вакцины против рака.....	91
Степаненко Л. А., Сухов Б. Г., Конькова Т. В., Бединская В. В., Клушина Н. В., Злобин В. И. Определения фагоустойчивости антибиотикорезистентных штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> на основе исследования структур CRISPR/Cas систем в их геномах.....	94
Сучкова И. О., Нониашвили Е. М., Дергачева Н. И., Паткин Е. Л. <i>In utero</i> воздействие хлорида кадмия на полногеномное метилирование ДНК 12-дневных эмбрионов мыши: межгенерационное наследование эпигеномного эффекта.....	96
Тетерина Г. А., Рыбакова Д. А., Арефьева Н. А., Джигоев Ю. П., Саловарова В. П. Поиск CRISPR-Cas систем и протоспейсеров фагов в штаммах <i>E. coli</i>	99

Уткина А. С., Карагодин В. П. Нутригеномика и искусственный интеллект в биомедицине – новые инструменты и горизонты.....	102
Щелканов М. Ю., Белик А. А., Иунихина О. В., Потт А. Б., Белов Ю. А., Персиянова Е. В., Милованкин П. Г., Крылова Н. В. Конструирование праймеров для полногеномного секвенирования вируса Оз	104

БИОРАЗНООБРАЗИЕ И СИСТЕМАТИКА ОРГАНИЗМОВ

Бондарюк А. Н., Букин Ю. С. Эволюционный ландшафт вируса SARS-CoV-2.....	108
Петунина Ж. В., Ваврищук Н. В., Романова Е. В. Вариабельность морфологических и генетических признаков <i>Macrohectopus branickii</i>	111
Горбунова М. К., Козлова А. П., Румянцева М. Л. Трансдуктанты джамбо-фага <i>Sinorhizobium meliloti</i>	114
Dovgal I. V., Fahrni J., Qu Zhishuai. Diversity, Phylogeny and Systematics of Ciliate Subclass Chonotrichia.....	116
Ицкович В. Б., Афанасьева А. А., Глызина О. Ю. Видообразование у байкальских губок Lubomirskiidae – новые молекулярные и геномные маркеры....	119
Колесников П. М., Ломакина А. В., Шубинкова О. В., Букин Ю. С. Использование методов делимитации видов для оценки таксономического разнообразия микробных сообществ, исследованных на основе метабаркода по фрагменту гена 16s рРНК.....	122
Ляпунов А. В., Корзун В. М., Холин А. В., Лопатовская К. В. Таксономическая идентификация млекопитающих с помощью молекулярно-генетических методов по образцам мягких тканей, подвергшихся разрушению в результате действия различных неблагоприятных факторов.....	124
Мадьярова Е. В., Дягилева А. А., Дроздова П. Б., Тимофеев М. А. Популяционно-генетическое разнообразие байкальских эндемичных амфипод рода <i>Ommatogammarus</i> на разных глубинах озера в районе поселка Большие Коты.....	127
Матвеева Т. В. Клеточная Т-ДНК в филогенетических исследованиях растений	129
Налимова М. А., Марченков А. М., Захарова Ю. Р., Петрова Д. П. Определение генетического разнообразия пресноводной пеннатной водоросли <i>Ulnaria acus</i> (Kützing) Aboal Евразии.....	130
Нелюбина П. Е., Павличенко В. В., Протопопова М. В. Изучение пространственно-генетической структуры и филогенетических взаимоотношений популяций <i>Anemone altaica</i> (Ranunculaceae) в Южной Сибири.....	133

Петрова Д. П., Захарова Ю. Р., Марченков А. М., Букин Ю. С., Морозов А. А., Галачьянц Ю. П., Бедошвили Е. Д., Подунай Ю. А., Давидович О. И., Давидович Н. А., Лихошвай Е. В. Идентификация некоторых таксонов <i>Ulnaria</i> и <i>Fragilaria</i> (Bacillariophyceae) на основе генетических маркеров и данных морфологии и полового воспроизведения	136
Петухова О. С., Приставка А. А., Саловарова В. П. Сравнение первичной структуры эндоглоканаза из микроорганизмов с разными температурными пределами роста	138
Дэлгэрмаа С. Результаты микробиологического исследования дрожжей вида <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	141
Саранчина А. Е., Смирнова П. А., Индосова Е. Б., Мутин А. Д., Дроздова П. Б. Внутривидовое генетическое разнообразие байкальских амфипод в Южном Байкале и реке Ангаре	145
Темных А. В., Силаков М. И., Мельников В. В., Чудиновских Е. С. Исследование вертикального распределения мезопланктона с применением комплексной методики сетных ловов	147
Федотова И. С., Миронова Л. В. Определение структуры генетических локусов адаптации штаммов <i>Vibrio cholerae</i> на основе данных полногеномного секвенирования	150
Черезова В. М., Майор Т. Ю., Сапожникова Ю. П., Королева А. Г., Сидорова Т. В., Суханова Л. В. Поиск мобильных элементов в геномах и транскриптомах	153
Земская Т. И., Черницына С. М., Хальзов И. А., Ситникова Т. Я. Микробные сообщества, ассоциированные с бентосными животными Байкала	156
Шубенкова О. В., Ломакина А. В., Погодаева Т. В., Букин Ю. С., Букин С. В., Колесников П. М., Земская Т. И. Таксономическая структура микробного сообщества донных осадков в зоне флюидных потоков метанового сипа Красный Яр (Южный Байкал)	157
Щербакова А. А., Перетолчина Т. Е. Первые сведения о молекулярно-генетическом разнообразии мшанок класса Phylactolaemata Байкальского региона	159
Юдинцева А. В., Букин Ю. С. Исследование процессов накопления несинонимичных замен в белок-кодирующих участках митохондриальных геномов байкальских амфипод	162

ЭКОЛОГИЯ И РАЦИОНАЛЬНОЕ ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

Бедошвили Е. Д., Фирсова А. Д., Титова Л. А., Байрамова Э. М., Захарова Ю. Р., Сакирко М. В., Лихошвай Е. В. Сезонная динамика фитопланктона и ассимиляция кремния доминирующими видами диатомовых водорослей в оз. Байкал в 2021–2022 гг.	166
--	-----

Гамзатов Г. М., Тороян А. А., Дашидондокова Д. Б. Влияние загрязнения на уровень развития окислительного стресса у растений в условиях урбанизированной территории Читы	169
Глызина О. Ю., Сапожникова Ю. П., Яхненко В. М., Тягун М. Л., Аvezова Т. Н., Глызин Л. А., Кармаданова А. А., Королева А. Г., Волкова А. А., Оборина Е. А., Адамович С. Н., Суханова Л. В. Эколого-биохимические исследования байкальских сиговых рыб в условиях искусственного содержания.....	171
Гринберг М. А., Иванова А. В., Немцова Ю. А., Пирогова П. А., Ильин Н. В., Мареев Е. А., Воденев В. А. Модификация сигнальных систем растений как механизм изменения устойчивости к стрессорам в условиях хронического действия ионизирующего излучения и электромагнитных полей	173
Жученко Н. А., Мартынова Н. А. Использование индексов выветривания для оценки эколого-геохимического состояния дерново-подбуров в районе с. Большие Коты	176
Имидоева Н. А., Малыгина Е. В., Дмитриева М. Е., Бельшенко А. Ю., Шелковникова В. Н., Аксёнов-Грибанов Д. В. Бактерии рода <i>Streptomyces</i> sp., как потенциальные биологические деструкторы лигноцеллюлозы	179
Калугина О. В., Афанасьева Л. В. Изменение содержания аскорбиновой кислоты в хвое лиственницы сибирской на территории с жесткими природными условиями и хроническим воздействием техногенного загрязнения	181
Козлова А. А., Приставка А. А. Применение методов многомерной статистики при изучении почв Южного Предбайкалья.....	184
Куклина С. Л., Киселева Н. Д. Экологические особенности аллювиальных почв Приангарья	187
Лопатовская О. Г., Баснина Е. И. Нарушенные сельскохозяйственные земли Иркутской области.....	189
Мартынова Н. А. Эколого-биологическая характеристика фосфоритных почв и ландшафтов Северной Монголии Байкальской рифтовой зоны	192
Мельников В. В. Роль анаэроконтура в функционировании экосистемы пелагиали Черного моря	195
Окулова Е. С., Тулаева И. А., Матвеева Т. В. Полиморфизм гена цитохрома b у форм клеща <i>Tetranychus urticae</i> Koch устойчивого к бифеназату	198
Печёрина А. А., Агеева М. Н., Гринберг М. А., Занегина Д. А., Дмитриева А. А., Ладейнова М. М., Брилкина А. А., Воденев В. А. Растения с флуоресцентными сенсорами: создание и особенности использования в исследованиях действия абиотических и биотических стрессоров.....	199
Русановская О. О., Бехтин С. Б., Демидова А. А., Шимараева С. В., Зилов Е. А. Использование искусственного интеллекта для мониторинга экосистемы озера Байкал	201

Серегин С. А., Попова Е. В. Микрозоопланктон Севастопольской бухты: видовое разнообразие и структура сообщества в локальных акваториях в весенний период	204
Тулаева И. А., Матвеева Т. В., Сокорнова С. В. Методические подходы к определению устойчивости <i>Tetranychus urticae</i> Koch к различным акарицидам	207
Дамбаев Д. Д., Дамдинова Р. Д., Матафонов А. Ю., Митупов Ж. Б., Убушеева В. Б., Ярославский Д. В. Гендерные особенности накопления макро- и микроэлементов в волосах студентов Читинской государственной медицинской академии.....	209
Чечкова Н. А. Бактерицидная активность эпидермальной слизи радужной форели, выращенной в условиях искусственного воспроизводства	213

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Белоусов Д. С., Малков Ю. А., Беловежец Л. А. Технология глубоинного культивирования высших базидиальных грибов	217
Верхотурова С. А., Лозовая Т. С., Куприна О. В. Влияние дигидрокверцетина на хранение кондитерского крема.....	219
Герасимчук А. Л., Франк Ю. А., Бухтиярова П. А., Ивасенко Д. А. Культивируемые микроорганизмы-деструкторы органического вещества из природных осадков, подвергаемых антропогенному воздействию	222
Драница И. С., Подсохин М. С., Приставка А. А., Юринова Г. В., Михайленко В. Л. Культивирование <i>Trichoderma viride</i> на лигноцеллюлозных отходах со свалок предприятия АО «Группа Илим».....	225
Золотовская Е. Д., Назарова А. А., Власевская А. Д., Дроздова П. Б., Тимофеев М. А. Протеом гемцитов байкальских амфипод вида <i>Eulimnogammarus verrucosus</i>	228
Киенская К. И., Донская Л. С., Бобровницкий С. К., Олейник Е. С., Буторова И. А. Новые производные триазолов как перспективные не-антибиотики для сельского хозяйства.....	231
Козлов С. Н., Марков Е. Ю., Николаев В. Б., Урбанович Л. Я., Миронова Л. В., Корнева А. В., Куликалова Е. С. Определение аспарагиназной активности в бесклеточных экстрактах бактерий возбудителей ООИ методом радиальной энзимодиффузии в агарозном геле	233
Коновалова Ж. А., Андреевская Н. М., Дихтярева И. А., Ивашкова О. Н., Юденич С. В., Балахонов С. В. Обеспечение качества технологического процесса лиофилизации в производстве медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>	237
Лукьянова С. В., Гефан Н. Г., Войченко Н. А., Оборина Е. Н., Катеринич М. Д., Адамович С. Н. Гидрометаллатраны: исследование биологической активности <i>in silico</i> и <i>in vitro</i>	240

Мардини М., Ермолаев А. С., Хрусталева Л. И. Разработка метода прямого ПЦР-анализа пыльцевых зерен лука репчатого <i>Allium cepa</i> L.	243
Новиков А. В., Приставка А. А., Саловарова В. П. Синтез целлюлаз <i>Trichoderma viride</i> при глубинном культивировании в присутствии разных целлюлозных субстратов.....	245
Нурминская Ю. В., Максимова Л. А., Копытина Т. В., Еникеев А. Г. Трансгенные растения как объект для изучения стохастической изменчивости.....	247
Павличенко В. В., Протопопова М. В. Контрастные фенотипы трансгенного тополя: от карлика до гиганта	251
Пеньдюхова А. С., Михайленко В. Л., Приставка А. А., Верхотурова С. И., Белогорлова Н. А., Юринова Г. В. Взаимодействие пиридил-, фенилсодержащих фосфинов и их производных с тест-культурами микроорганизмов по данным спектроскопии ЯМР	254
Перфильева А. И. Комплексное исследование биологической активности металлсодержащих нанобиокомпозитов – потенциальных агентов для ростостимуляции и оздоровления культурных растений	257
Поливанова О. Б., Бедарев В. А. Экспрессия генов центрального фенилпропаноидного метаболического пути <i>Origanum vulgare</i> при воздействии солевого стресса	260
Стоянов К. Н. Обогащение личинок мух жирными кислотами семейства омега-3	263
Шевченко А. Н. Изучение токсикологического действия кормовой добавки НАА.....	265

ПЛЕНАРНЫЕ ДОКЛАДЫ

УДК 579.66

МИКРОБНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ДРЕВЕСНЫХ ОПИЛОК: ОТ ЛАБОРАТОРНЫХ ОПЫТОВ ДО ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Л. А. Беловежц, Ю. А. Малков, Д. С. Белоусов, Д. О. Самульцев

*Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Россия
lyu-sya@yandex.ru*

The possibilities of targeted microbial transformation of sawdust with the help of the association of wood-destroying fungi are investigated. The effectiveness of the ongoing processes is shown. The technology of industrial processing (up to 3000 m³) has been worked out.

Несмотря на развитие технического оснащения лесоперерабатывающей отрасли, проблема большого количества отходов (кора, опилки, стружки, щепа) остается актуальной. Общий объем потерь составляет до 50 % от биомассы древесины, из которых минимум 15 % приходится на чистые опилки. Если использование свежих опилок возможно для производства пеллет или брикетов, то лежалые опилки никак не используются, создавая экологическую напряженность на прилегающих к лесопилкам территориях. Следовательно, технология, позволяющая утилизировать древесные опилки любого качества, является актуальной. Целью нашей работы была разработка малозатратной и эффективной схемы такой технологии.

Проведенные лабораторные исследования позволили сформировать ассоциацию дереворазрушающих грибов, состоящую из пяти микроорганизмов, максимально эффективно трансформирующих опилки (потеря целлюлозы составляет 31,5 %, а лигнина – 25,1 %). В связи с тем что процессы переработки опилок требуют саморазогрева трансформируемой смеси, в дальнейшем проводили полевые эксперименты на опилках различных видов древесины, разного срока хранения и в различных регионах России. Объем опилок составлял 20–120 м³. Основным критерием правильного протекания процесса являлся подъем температуры до 45–55 °С (рис. 1). Окончание трансформации констатировали по отсутствию фитотоксичности продукта.

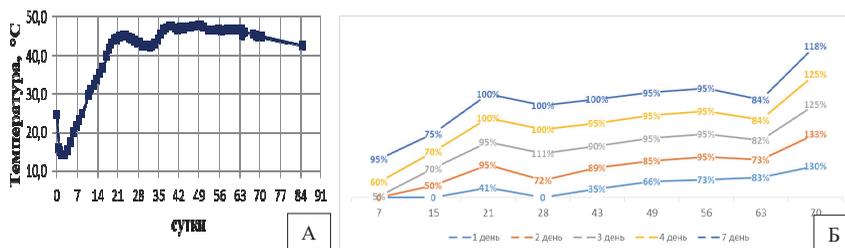


Рис. 1. Параметры процесса компостирования.
А – температура; Б – фитотоксичность

Во всех случаях (8 экспериментов, 2008–2020 гг.) разогрев смеси происходил на 3–4-е сут после закладки, и температура держалась в течение 80–90 сут, плавно снижаясь к концу компостирования. Фитотоксичность резко возрастала через 3–4 недели переработки, оставаясь высокой до 60–70 дня. Затем отмечалось ее отсутствие, с появлением ростостимулирующего эффекта на 90-е сут эксперимента. Интересно, что варьирование состава опилок, места и времени проведения компостирования практически не влияли на агрохимические показатели готового продукта. Так, содержание общего азота колебалось от 1,62 до 2,22, а фосфора – от 0,22 до 0,44. Положительным моментом можно считать появление подвижных форм основных агрохимически важных элементов. Емкость катионного обмена возрастала до уровня верхового торфа, а гидrolитическая кислотность оказывалась существенно ниже. Данные показатели очень важны для сохранения почвенного гомеостаза. Совпадение по многим показателям с верховым торфом позволяет сделать вывод о высоком качестве готового продукта, а значительно большее количество подвижных форм биогенных элементов и оптимальный pH позволит использовать опилочный компост без внесения дополнительных питательных веществ. Проведенные нами исследования готовых компостов на содержание тяжелых металлов, мышьяка и патогенных микроорганизмов показали полное соответствие продуктов санитарно-эпидемиологическим нормам и ПДК.

Дальнейшая работа была направлена на масштабирование процесса. Это потребовало разработки технологии выращивания высших базидиальных грибов в условиях глубинного периодического культивирования в ферментере объемом 100 л (рис. 2). Были оптимизированы – режим подачи воздуха, скорость перемешивания, длительность культивирования и объем вносимой маточной культуры. Все это позволило увеличить выход жизнеспособной биомассы до 700 г по абсолютно сухому веществу. Такое количество грибов способно переработать до 700 м³ опилок.



Рис. 2. Установка для культивирования грибов

Таким образом, нами была создана ассоциация микроорганизмов, способная в короткие сроки переработать большое количество опилок с получением качественного удобрения. Масштабирование процесса привело к разработке технологии периодического глубинного культивирования высших базидиальных грибов, что позволило нам увеличить объемы перерабатываемых опилок до 3000 м³ одновременно.

УДК 579.2

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ АДАПТИВНОЙ РАДИАЦИИ В БУКЕТАХ БЛИЗКООРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ

Ю. С. Букин^{1,2}, М. Д. Бережной², Т. Е. Перетолчина¹, Д. Ю. Щербаков^{1,2}

¹*Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия*

²*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия*
bukinyura@mail.ru

The work presents the results of modeling the processes of filling vacant ecological niches in a closed ecosystem with new species in the process of speciation. The dynamics of filling free ecological niches with new species is studied, depending on the number of ecological niches and the speed of the speciation process.

В существующем разнообразии экосистем в биосфере Земли можно выделить особый класс замкнутых экосистем, характеризующихся незначительной скоростью проникновения новых видов извне. Большая часть видов в замкнутых экосистемах являются эндемиками, сформировавшимися благодаря внутренним процессам видообразования. Примерами таких экосистем являются древние озера, геотермальные источники срединно-океанических хребтов. Такие экосистемы характеризуются большим видовым разнообразием, которое в рамках геологического времени Земли возникло за очень небольшие промежутки времени (от 1 до 30 млн лет). Одной из самых исследованных замкнутых экосистем является оз. Байкал, в котором описано более 2750 эндемичных видов, относящихся к разным таксономическим группам (растениям животным, микроорганизмам) [1]. Эндемики Байкала заняли экологические ниши во всех биотопах озера (прибрежно-заплесковая зона, литораль, пелагиаль, глубоководная зона). Остаётся открытым вопрос о том, какие закономерности в эволюции приводят к формированию богатых видами экосистем за достаточно непродолжительные промежутки времени.

Для исследования вопроса о временных промежутках, необходимых для заполнения видами замкнутой экосистемы может быть использован подход имитационного моделирования. Первичные предположения для такой модели могут быть следующими: имеется замкнутая экосистема с некоторым количеством свободных экологических ниш; в экосистему внедряется один или несколько видов, которые с определённой вероятностью могут давать эволюционную дивергенцию (давать дочерний вид) с занятием свободной экологической ниши; дочерние виды также будут участвовать в видообразовательном процессе. Под экологической нишей в такой модели понимается место, занимаемое видом в биоценозе, включающее комплекс его биоценологических связей и требований к факторам среды. Разработав имитационный алгоритм такой модели, и, проведя вычисления, можно оценить зависимость среднего времени заселения экосистемы видами в зависимости от первоначального количества свободных экологических ниш и вероятности эволюционной дивергенции в единицу времени.

Цель проводимой работы можно сформулировать следующим образом: исследовать зависимость времени, необходимого на заполнение всех экологических ниш в экосистеме, эволюционная история которой начинается с одного вида в зависимости от первоначального количества свободных экологических ниш и вероятности эволюционной дивергенции (разделения одного вида на два дочерних с занятием новой экологической ниши) методом имитационного компьютерного моделирования. Для исследования процесса использовать метод имитационного компьютерного моделирования.

Для реализации модели применен принцип объектно-ориентированного имитационного моделирования [2]. В модели имеется 1 стартовый вид и $n-1$ свободная экологическая ниша. Каждый вид в модели может за один временной шаг (1 эволюционное поколение) дивергировать на два вида с вероятностью λ . При дивергенции вид – предок остается в своей экологической нише, а вид – потомок переходит в другую экологическую нишу. Через некоторое время существования экосистемы все свободные экологические ниши будут заполнены. Время заполнения всех ниш (tp) будет случайной величиной, зависящей от количества ниш и вероятности эволюционной дивергенции.

Результаты моделирования (рис. 1) позволяют установить закономерность взаимосвязи между количеством свободных экологических ниш в экосистеме, вероятностью видовой дивергенции λ и временем, необходимым для заполнения всех ниш со стартового состояния с одним исходным видом.

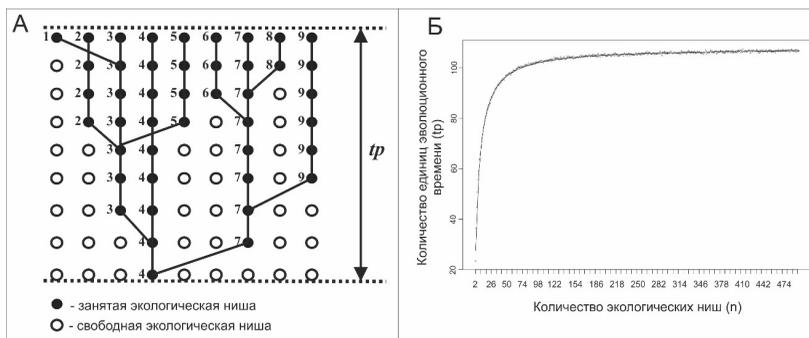


Рис. 1. А. Схема эволюционного процесса в экосистеме, имеющей 9 свободных экологических ниш и один первоначальный вид в нише 4, tp – временной промежуток, за который заполняются все ниши в результате эволюционной дивергенции. Б – оценка зависимости среднего времени заполнения всех экологических ниш tp от количества экологических ниш по результатам моделирования

Эта закономерность при достаточно больших значениях n описывается уравнением Михаэлиса следующего вида:

$$tp = \frac{T_{\max} \cdot n}{T_{\text{half}} + n}, \quad (1)$$

в этом уравнении tr – среднее время, необходимое для заселения всех ниш, n – количество свободных ниш в экосистеме. Параметр T_{\max} – максимальное время, требующееся для заселения всех ниш, параметр T_{half} – время, необходимое для заселения половины экологических ниш. Значение параметров T_{\max} и T_{half} уменьшается при увеличении вероятности видовой дивергенции λ . Уравнение (1) позволяет сделать вывод о том, что в замкнутой экосистеме время, необходимое на заселения всех ниш, не будет увеличиваться до бесконечности, при увеличении количества стартовых свободных экологических ниш n . Время заселения всегда будет ограничено сверху значением T_{\max} уравнения (1).

На основе результатов моделирования можно сделать вывод, что биологическое свойство замкнутых экосистем таково, что за малые промежутки времени будет формироваться достаточно большое видовое разнообразие, состоящее из букетов близкородственных эндемичных видов.

Работа выполнена при поддержке темы № 121032300196-8 бюджетного финансирования ЛИИ СО РАН.

Список литературы

1. Kozhova O. M., Izmes'teva L. Lake Baikal: evolution and biodiversity. Backhuys Publishers, 1998. 447 p.
2. Semovski S. V., Sherbakov D. Y. Speciation and neutral molecular evolution in one-dimensional closed population // International Journal of Modern Physics C. 2003. Vol. 14. P. 973–983.

УДК 574.5

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПЛАНКТОНА ОЗЕРА БАЙКАЛ ЗА 80 ЛЕТ: ОТ ПРОБООТБОРА ДО НЕЙРОСЕТЕЙ

Е. А. Зилов, О. О. Русановская, С. В. Шимараева

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
eugenasilow@gmail.com*

Ecological monitoring of Lake Baikal plankton is fulfilled at point #1 since 1945. Phytoplankton and zooplankton are sampled year-roundly, the samples are processed with microscopes. The data bases were used as basis for information provision of rather multiple mathematic models. They were used for the analysis and prognosis both for the organization of ecosystem as well as for prediction of its behavior under different scenarios of nature use in the region. Self-organizing neural nets are used in Baikal plankton now. The current application of neural nets for the recognition of plankton organism images demonstrates quite appropriate results.

Систематические и первые круглогодичные исследования планктона оз. Байкал начал В. Н. Яснитский в 1926 г. [11–12]. С февраля 1945 г. под руководством М. М. Кожова начался регулярный экологический мониторинг планктона на «Точке №1». Она расположена в Южном Байкале, напротив поселка Большие Коты (51°52'48" с. ш., 105°05'02" в. д., расстояние 2,7 км от берега, над глубиной 800 м). Фитопланктон отбирается батометром с глубин 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 м. Учитывается около 500 форм фитопланктона. Зоопланктон отбирается закрывающейся сетью Джели с диаметром входного отверстия 37,5 см из мельничного газа с ячеей диаметром 0,1 мм со слоев 0–10, 10–25, 25–50, 50–100, 100–150, 150–250 м. Учитывается более 700 форм зоопланктона. Температура воды на глубинах 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 м измеряется термометром, вмонтированным в батометр. Прозрачность определяется по белому диску Секки. Все эти процедуры со времен М. М. Кожова выполняются по раз и навсегда принятой схеме. Это позволяет, например, сравнить данные 2015 г. с материалами 1945 г. не опасаясь того, что отличие данных вызвано другими методами или материалами, использованными при их получении.

Накопленный массив данных (более 7 млн записей) не имеет себе равных как по долговременности наблюдения (на 20–30 лет длиннее любых других аналогичных рядов наблюдений), так и по разрешению (30–50 отборов проб в год, по сравнению с обычными 5–12 отборами). Проект внесен в Книгу рекордов России как самый длительный в мире проект экологического мониторинга [2].

Первые фундаментальные обобщения о работе экосистемы оз. Байкал, во многом по материалам мониторинга, были сделаны М. М. Кожовым в его классической монографии [3]. Начиная с 1970-х гг. собранные в мониторинговых наблюдениях материалы начинают использоваться при моделировании экосистемы Байкала. Динамика планктонного сообщества теоретически анализируется с привлечением современных на то время компьютерных методов. Оформляется методология прогнозирования состояния экосистемы, что отразилось рядом коллективных монографий, вышедших в издательстве «Наука» [5–9] и

обобщено монографией [4]. Компьютерная база данных в начале XXI века была переведена в форму, доступную для работы с ней с ПК. Был разработан и новый аппарат математического моделирования и прогноза состояния байкальского планктона. Он опирался на семейство разных моделей и интегральных показателей и учитывал влияние внешних факторов, в том числе и антропогенных, на планктон [1].

С сентября 2022 г. исследователи из НИИ биологии Иркутского государственного университета совместно с командой облачной платформы Yandex Cloud, предоставляющей облачные вычислительные мощности и инфраструктуру, экспертами по созданию алгоритмов машинного обучения для морских экосистем компании MaritimeAI и специалистами Фонда поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал», начали использовать систему с нейросетями в мониторинге экосистемы оз. Байкала. Этот алгоритм, основанный на искусственном интеллекте, анализирует пробы воды из озера, определяет и классифицирует содержащиеся в ней взвешенные частицы органического происхождения.

Система автоматического анализа проб (СААП) включает в себя пользовательский интерфейс для работы специалистов НИИ, подсистемы хранения и обработки проб, интеграцию с Яндекс. Толокой [10]. Пользовательский интерфейс позволяет сотрудникам НИИ биологии ИГУ самостоятельно повышать эффективность и контролировать качество работы алгоритма. На втором этапе в систему внедряются подсистемы автоматической детекции и классификации, что позволяет часть изображений обрабатывать без участия специалиста. Сейчас идет активное обучение модели на пополняющемся наборе данных. Он пополняется изображениями проб, напрямую из поля зрения микроскопа, которые специалисты загружают в СААП. Нейросеть продолжает обучаться в сервисе для разработки и эксплуатации ML-алгоритмов Yandex DataSphere. На следующем этапе планируется значительно снизить количество изображений, обрабатываемых вручную. Сейчас СААП умеет работать с 70 видами зоопланктона, которые чаще всего встречаются в пробах. Изображения проб байкальской воды с лабораторных микроскопов продолжают поступать в систему, где детектируются все возможные объекты в пробе, затем определяется их видовая принадлежность и формируются отчетные карточки.

Анализ результатов показал, что в 30 % случаев различия в видовом разнообразии и численности между ручной и машинной обработкой отсутствуют. В целом различий в видовом разнообразии между ручной и машинной обработкой проб не наблюдается, нейросеть определяет все виды, находящиеся в пробе. Различия отмечены только в численных показателях. Уже сейчас это первая в мире успешно работающая система автоматического определения видового состава зоопланктона. При обучении её определять организмы фитопланктона она станет первой в мире системой автоматического определения видового состава планктона.

Работа поддержана Министерством высшего образования и науки РФ (№ FZZE-2023-0005), и Фондом поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал» (<https://baikalfoundation.ru/project/tochka-1/>).

Список литературы

1. Зилов Е. А. Анализ и прогноз изменений водных экосистем на основе модельных экспериментов. 2-е изд. М. : Книга по требованию, 2014. 258 с.
2. Книга рекордов России. Самый длительный проект регулярного экологического мониторинга в истории науки в мире. URL: <https://knigarekordovrossii.ru/rekordy/nauka-i-obrazovanie/11-samyu-dlitelnyu-proekt-regulyarnogo-ekologicheskogo-monitoringa-v-istorii-nauki-v-mire/> (дата обращения: 03.08.2023).
3. Кожов М. М. Биология озера Байкал. М. : Изд-во АН СССР, 1962. 316 с.
4. Кожова О. М., Бейм А. М. Экологический мониторинг Байкала. М. : Экология, 1993. 352 с.
5. Геологические и экологические прогнозы / ред. О. М. Кожова. Новосибирск : Наука, 1984. 217 с.
6. Долгосрочное прогнозирование состояния экосистем / ред. О. М. Кожова, Л. Я. Ащепкова. Новосибирск : Наука, 1988. 238 с.
7. Приемы прогнозирования экологических систем / ред. О. М. Кожова, Л. Я. Ащепкова. Новосибирск : Наука, 1985. 127 с.
8. Прогнозирование экологических процессов / ред. О. М. Кожова, В. Н. Паутова, В. В. Черепанов. Новосибирск : Наука, 1986. 214 с.
9. Изменчивость природных явлений во времени / ред. О. М. Кожова, Т. Г. Рященко. Новосибирск : Наука, 1982. 223 с.
10. Толока. URL: <https://toloka.yandex.ru/tasks> (дата обращения 12.07.2023).
11. Яснитский В. Н. Материалы к познанию планктона озера Байкал // Тр. Иркут. о-ва естествоиспыт. 1923. Т. 1, вып. 1. С. 31–74.
12. Яснитский В. Н. Результаты наблюдений над планктоном Байкала в работах Биологической станции за 1926–1928 гг. // Изв. Биол.-геогр. науч. -исслед. ин-та при Иркут. ун-те. 1930. Т. 4, Вып. 4. С. 191–238.

УДК 576.32/.36

ОДОРАНТ-ЗАВИСИМАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ОБОНЯТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

И. В. Клименков^{1,2}, Н. П. Судаков¹

¹Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

²Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
iklimen@mail.ru

It was shown that actin microfilaments in the dendrites of olfactory receptor cells performs an important function in primary transduction of chemical signals.

Обоняние выполняет ведущую роль в организации поведения животных, принимая участие в обеспечении их репродукции, питания и социальных взаимодействий [1]. С помощью методов электронной и лазерной конфокальной микроскопии показано, что хеморецепторные нейроны периферического отдела обонятельной системы претерпевают структурные перестройки в процессе их раннего морфогенеза, на завершающих этапах созревания, а также в процессе функционирования в жизненном цикле животных. В частности, установлено [2], что важную роль в ходе развития и адаптивных перестроек обонятельных клеток выполняют элементы цитоскелета – актиновые микрофиламенты. Так, в процессе миграции новообразованных молодых нейронов значительная доля их ядерного материала проникает внутрь дендрита, в примембранном слое которого формируется плотный актиновый кортекс. Благодаря этому клетка принимает наиболее удобную форму для перемещения в межклеточном пространстве между базальной мембраной и апикальными отделами сенсорного эпителия. После установления связи терминали дендрита с внешней средой в примембранном слое F-актина формируется пора, через которую, как предполагается, от одорант-связывающих рецепторов может проходить первый внутриклеточный сигнал, необходимый для стабилизации экспрессии гена, кодирующего обонятельные рецепторы.

По нашим представлениям, плотная сеть актиновых микрофиламентов может быть высокоизбирательным фильтром в процессах диффузии различных молекул, сопряженных с трансдукцией химических сигналов, а также препятствовать проведению биохимического сигнала внутрь клетки. Представляется возможным, что процессы полимеризации/деполимеризации актиновых микрофиламентов в примембранной зоне апикального участка рецепторных клеток могут быть характерны не только для незрелых нейронов в ходе их миграции, но и для зрелых (с экспрессией рецепторного белка) клеток. Это может обеспечивать регуляцию их чувствительности к пахучим веществам, действующим в различных концентрациях. То есть в отсутствии молекул одоранта такая полимеризация актина должна быть минимальной, а при избытке химических сигналов в окружающей среде она должна возрастать для адекватного ослабления хемостимуляции клетки. Наши экспериментальные исследования, проведенные

на рыбах различных видов, свидетельствуют, что в отличие от контроля, после непродолжительного (1–2 сут.) одорантного воздействия гетерогенной смеси аминокислот и пептидов апикальные участки дендритов многих рецепторных клеток содержат повышенную плотность актиновых микрофиламентов, которые могут обеспечивать их десенситизацию (рис. 1).

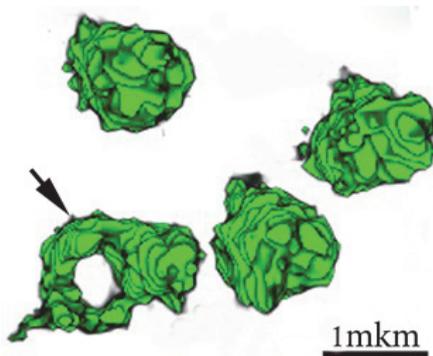


Рис. 1. Апикальные участки четырех дендритов обонятельных рецепторных клеток у суматранского барбуса (*Barbus tetrazona tetrazona* Bleeker, 1855) после краткосрочного (2 сут) воздействия гетерогенной смеси аминокислот и пептидов в концентрации 0,00002 %. В отличие от дендрита, свойственного для контроля (отмечен стрелкой), три терминали дендрита содержат повышенную плотность актиновых микрофиламентов. Окраска на F-актин (фаллоидин-FITC), конфокальная микроскопия, 3D-реконструкция в режиме «blend»

Таким образом, регуляция чувствительности к пахучим веществам в зрелых клетках реализуется не только через биохимические каскады трансдукции сигналов [3], но и посредством структурных перестроек актинового цитоскелета, ассоциированного с примембранным слоем терминали дендрита. Следует отметить, что впервые выявленные нами факты ремоделирования актина в дендритах хеморецепторных клеток структурно сходны с процессами реорганизации актиновых микрофиламентов, которые являются неотъемлемой частью механизмов созревания и пластичности дендритических шипиков нейронов в центральной нервной системе [4; 5]. Это может свидетельствовать об общих структурно-функциональных принципах поддержания и регуляции первичных процессов рецепции одорантов терминалями дендритов обонятельных клеток и нейромедиаторов дендритическими шипиками центральных нейронов мозга. Таким образом, проведенные исследования показывают, что процессы полимеризации/деполимеризации актинового цитоскелета в рецептивном участке обонятельных клеток выполняют важную роль в обеспечении первичных процессов хеморецепции, поддерживая адекватный уровень их стимуляции при переменных режимах воздействия одорантов различной природы. Полученные результаты создают предпосылки для более глубокого понимания механизмов ольфакторного восприятия одорантов внешней среды.

Список литературы

1. Glezer I., Malnic B. Olfactory receptor function// *Handb Clin Neurol*. 2019. N 164. P. 67–78.
2. Rearrangement of Actin Microfilaments in the Development of Olfactory Receptor Cells in Fish / N. P. Sudakov, M. V. Pastukhov, M. M. Svinov, N. S. Kositsyn // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, N 1. Art. 3692.
3. Ache B. W. Position Review: Functional Selectivity in Mammalian Olfactory Receptors // *Chem Senses*. 2020. N 7. P. 503–508.
4. Obashi K., Taraska J. W., Okabe S. The role of molecular diffusion within dendritic spines in synaptic function // *J Gen Physiol*. 2021. Vol. 153, N 4. e202012814.
5. Kashiwagi Y., Okabe S. Imaging of spine synapses using super-resolution microscopy // *Anat Sci Int*. 2021. N 3. P. 343–358.

УДК 575.8+574.9

ПРОИСХОЖДЕНИЕ *FRITILLARIA SONNIKOVAE* (LILIACEAE) В ЮЖНОЙ СИБИРИ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

М. В. Протопопова^{1,2}, В. В. Павличенко^{1,2}, Д. В. Санданов^{3,4}

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

³Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия

⁴Тункинский национальный парк, с. Кырен, Россия

marina.v.protopopova@gmail.com

Our study is an original attempt to shed light on the *F. sonnikovae* origin and its evolutionary relationships with other *Fritillaria* using nuclear (ITS) and plastid (*matK* + *rps16* + *trnH-psbA*) DNA markers. Based on our results, we suggest considering *F. sonnikovae* as a synonym for *F. maximowiczii*. In this view, *F. sonnikovae* may be considered a narrow endemic and one of the light-perianth morphs of *F. maximowiczii*, which has emerged in the Western Sayan and remained there as a tertiary relict.

Fritillaria Tourn. ex L. род семейства Liliaceae, включающий немногим более 150 видов, встречающихся в умеренной части Северного полушария. *Fritillaria sonnikovae* Shaulo&Erst самый последний описанный вид рода среди сибирских таксонов и являющийся узколокальным эндемом Западного Саяна. В разделе диагноза *F. sonnikovae*, посвященному потенциальному родству, авторы приводят лишь *F. dagana* Turcz. и *F. roylei* Hook [1]. Тем не менее детальный морфологический или молекулярно-генетический сравнительный анализ до настоящего времени не проводился. Таким образом, наше исследование представляет собой первую попытку пролить свет на происхождение *F. sonnikovae* и эволюционные связи с другими видами *Fritillaria* с использованием молекулярно-генетических данных. В работе были проанализированы образцы *F. sonnikovae*, являющиеся изотипами, которые представлены в гербарии Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (NS). В качестве референтных нами были дополнительно собраны образцы двух видов *Fritillaria* с сибирским ареалом: *F. dagana* Turcz. (Западный и Восточный Саян) и *F. maximowiczii* Freyn (Аргунская Даурия). В качестве молекулярно-генетических маркеров были использованы последовательности ядерной (ITS) и пластидной (*matK* + *rps16* + *trnH-psbA*) ДНК. Для анализа пластидной ДНК использовали прямое секвенирование очищенных ПЦР продуктов по методу Сэнгера, для анализа полиморфизма ITS региона применяли молекулярное клонирование с последующим секвенированием плазмидной ДНК. Данные о нуклеотидных последовательностях других референтных видов, использованных в филогенетическом анализе, были импортированы из GenBank. В общей сложности в анализе было использовано 45 последовательностей ITS региона и 36 последовательностей пластидной ДНК. Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия (ML) в MEGA v.7.0.16 и байесовским анализом (BI) на осно-

ве метода Монте-Карло для марковских цепей с учетом оптимальных моделей нуклеотидных замен и F81-подобной модели для бинарных данных (делеции/инсерции) в MrBayes v.3.2.7. Подробное описание использованных подходов приведено в нашей оригинальной работе [2].

Филогенетический анализ показал, что *F. sonnikovae* вместе с *F. dagana* и *F. maximowiczii* принадлежит к североазиатской линии подрода *Liliorhiza*. Выявлено тесное родство *F. sonnikovae* и *F. maximowiczii*, которые объединялись в общую группу. В то же время внутри группы монофилия *F. sonnikovae* не была достоверно подтверждена. Близкое родство двух видов также подтверждает сходство их морфологии. Согласно проведенной филогенетической реконструкции *F. dagana* является сестринским таксоном клады *F. maximowiczii* + *F. sonnikovae*. Это означает, что первый вид не может претендовать на статус ближайшего родственника для *F. sonnikovae*. Мы также не получили доказательств, подтверждающих родство между *F. sonnikovae* и *F. roylei*. Основываясь на полученных результатах, мы предлагаем рассматривать *F. sonnikovae* как синоним *F. maximowiczii*. С этой точки зрения *F. sonnikovae* можно считать узким эндемиком и одной из морф *F. maximowiczii*, возникшей в Западном Саяне и сохранившейся в этих местообитаниях как третичный реликт.

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к оборудованию, гербариям KRSU, NS и UUH за предоставленную возможность размещения и отбора образцов для молекулярно-генетических исследований, соавторам оригинальной работы [2] И. Ю. Селютиной и Н. В. Степанову за помощь в сборе материала. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00501, <https://rscf.ru/project/23-24-00501/>

Список литературы

1. Shaulo D. N. A New Species of *Fritillaria* L. (Liliaceae) from West Sayan / D. N. Shaulo, A. S. Erst // *Turczaninowia*. 2010. Vol. 13. P. 46–49.
2. The Curious Case of *Fritillaria sonnikovae* (Liliaceae) in South Siberia: New Insights into Its Origin and Phylogeny / M. Protopopova [et al.] // *Diversity*. 2023. Vol. 15 (2). Art. 193. P. 1–21.

УДК 578.72

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ВИРУС VV-GMCSF-LACT – ОТ РАЗРАБОТКИ ДО КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В. А. Рихтер¹, Е. В. Кулигина^{1,2}, О. А. Коваль¹, Г. В. Кочнева³

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск, Россия

²ООО Онкостар, Сколково, Москва, Россия

³ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия
richter@niboch.nsc.ru

The report is devoted to the development of a new anticancer drug based on the oncolytic virus VV-GMCSF-Lact. The drug was developed by genetic modification of the vaccinia virus. Data on preclinical studies and the current state of clinical trials of the drug are presented in detail.

Рекомбинантный вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact был создан на основе отечественного штамма осповакцины Л-ИВП.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* была продемонстрирована высокая цитотоксическая активность и противоопухолевая эффективность вируса в отношении опухолевых клеток человека различного происхождения. Кроме того, была показана способность вируса подавлять развитие метастазов.

Доклинические исследования препарата на основе созданного вируса подтвердили его безопасность и эффективность на животных моделях рака молочной железы. Препарат был рекомендован для клинических исследований.

В ноябре 2021 г. получено разрешение Минздрава РФ на проведение первой фазы клинических исследований по Протоколу Oncolact 2020 «Открытое мультикогортное исследование I фазы безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, раствор для инъекций, замороженный, у пациенток с рецидивирующим и/или рефрактерным метастатическим раком молочной железы в последовательных когортах с эскалацией дозы при однократном и многократном введении». Это первый российский препарат на основе онколитического вируса, получивший разрешение на проведение клинических исследований.

Исследование проводится в два этапа.

Этап 1 – однократное введение. Лекарственный препарат применяется интратуморально однократно в дизайне «3+3» в дозах от 10^7 до 10^8 БОЕ. Максимально переносимой (МПД) будет считаться доза, более низкая по отношению к дозе, на которой была определена дозолIMITирующая токсичность.

Этап 2 – многократное введение. Лекарственный препарат будет применяться интратуморально 1 раз в неделю в течение 4 недель в 3 дозах, определенных по результатам этапа 1: МПД и 2 более низкие дозы.

В докладе представлены результаты доклинических и текущее состояние клинических исследований.

УДК 616.24-002.5-089

ОНЛАЙН-СЕРВИС ДЛЯ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К БЕДАКВИЛИНУ ПО МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМ ДАННЫМ

В. В. Синьков¹, И. Г. Кондратов¹, О. Б. Огарков^{1*}, С. Н. Жданова¹,
А. П. Носков², П. А. Хромова¹, Е. А. Орлова¹, Л. В. Рычкова¹,
Л. И. Колесникова¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

²Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, г. Иркутск, ул. Россия
*obogarkov@yandex.ru

The aim of the research was to test a system for automated interpretation of results for predicting resistance to bedaquiline by the molecular data. Complete agreement between the phenotypic and genotypic analysis of resistance to bedaquiline was found for three strains from Yakutia. One genome with significant mutations to bedaquiline was identified. A conclusion was made about the importance of molecular analysis of target genes with subsequent detection of resistance to bedaquiline *in silico*.

Бедаквилин – новый и многообещающий противотуберкулёзный препарат, однако, при длительном лечении к нему развивается устойчивость. Это связано преимущественно с мутациями в генах *atpE* и *mpmR* у *M. tuberculosis*.

Цель – апробация системы автоматизированной интерпретации результатов при прогнозировании устойчивости к бедаквилину на основе молекулярно-биологических данных.

Материалы и методы. ДНК выделяли из штаммов *M. tuberculosis* циркулировавших в Иркутской области и Саха (Якутии). Общее количество исследованных ДНК составило 27 штаммов из Якутии и 21 штамм из Иркутской области. Исследование геномов МБТ было проведено на ДНК штаммов, полученных авторами ранее на территориях Иркутской области ($n = 5$), Республики Саха Якутия ($n = 4$), Республики Бурятия ($n = 3$), Забайкальского края ($n = 4$) и Дальнего Востока ($n = 8$). Для выявления устойчивости к бедаквилину на основе нуклеотидной последовательностей генов и геномных данных мы использовали программу BSATool. При использовании секвенирования по Сэнгеру анализировались гены *atpE* и *mpmR*, при полногеномном секвенировании исследовались мутации в этих же последовательностях, а также дополнительно в *mpmL5*, *mpmS5*, *Rv0678*, *Rv1979c* и *pepQ*.

Результаты. Обнаружено полное соответствие фенотипических и генотипических результатов оценки устойчивости к бедаквилину для трех штаммов из Якутии. Кроме того, при анализе геномных данных обнаружен один геном со значимыми мутациями, способных вызвать устойчивость к бедаквилину. Делается вывод об относительно низком распространении мутаций могущих вызвать устойчивость к этому антибиотику, что совпадает с данными других исследователей в России. Сделано заключение о важности молекулярно-биологического анализа генов-мишеней, с последующим выявлением устойчивости к бедаквилину *in silico*.

УДК 581.162.1:576.08:577.29

ЛАНДШАФТ РЕКОМБИНАЦИЙ У РАСТЕНИЙ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА КОНТРОЛЬ ЛОКАЛИЗАЦИИ КРОССИНГОВЕРА

Л. И. Хрусталева, Н. А. Кудрявцева, А. С. Ермолаев

Российский государственный аграрный университет –
Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева, г. Москва, Россия
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии, г. Москва, Россия
khrustaleva@rgau-msha.ru

In this study, we employed immunodetection of proteins, involved in recombination and synaptonemal complex formation (MLH1, MUS81, ASY1 and ZYP1) and analysis of chiasmata localization in two closely related *Allium* species (*A. fistulosum* L. and *A. cepa* L.), showing highly contrasting patterns of chiasmata distribution, and their F1 diploid and triploid hybrids. The availability of such a unique plant material allowed us to study the localization of chiasmata and the ratio of MLH1 and MUS81 on homeologous pairs *A. cepa* / *A. fistulosum* and on homologous pairs of *A. fistulosum* in the presence of a haploid set of *A. cepa* at pachytene in pollen mother cells (PMCs).

Рекомбинация (кроссинговер) – это обмен ДНК между материнской и отцовской хромосомами в ходе мейоза с образованием новых комбинаций генетического материала, который наследуется в следующем поколении. Мейотическая рекомбинация является важным механизмом пластичности и адаптивности организмов, и играет роль в видообразовании. Недавние исследования предоставляют новые доказательства генетической связи между рекомбинацией и гибридной стерильностью [1–3]. Классическая селекция растений полностью основана на мейотической рекомбинации и комбинаторики хромосом родителей при образовании гамет. Фундаментальные исследования генов, вовлеченных в контроль рекомбинации, напрямую связаны с успешной селекцией и созданием новых сортов растений с требуемыми ценными свойствами.

Места рекомбинаций у растений распределены не случайным образом по длине отдельных хромосом и строго контролируются [4; 5]. Механизмы формирования мест локализации рекомбинаций остаются в значительной степени неизвестными. У подавляющего большинства растений и животных рекомбинации преимущественно локализуются в дистальных 2/3 хромосомы. Виды со строго проксимально локализованными рекомбинациями среди растений и животных встречаются редко. Среди изученных видов растений известны только четыре вида с крайней локализацией рекомбинаций в регионе близко к центромере, включая лук-батун, *Allium fistulosum* [6]. *A. fistulosum* является богатым источником ценных генов, которые необходимы для селекции новых сортов лука репчатого (*A. cepa*) и улучшения его генофонда [7].

В данной работе мы изучали *in situ* локализацию белков, вовлеченных в рекомбинацию и сборку синаптонемного комплекса (MLH1, MUS81, ASY1 и ZYP1) с использованием иммунохимической детекции у *A. fistulosum* и *A. cepa* и F₁ гибридах между ними. Также был проведен анализ локализации хиазм, ко-

торые являются цитологическим проявлением рекомбинации, в этих двух близкородственных видах с контрастным распределением хиазм и F₁ гибридах между ними. Структура генома гибридов F₁ была изучена с помощью геномной *in situ* гибридизации (GISH). Были выявлены диплоидные F₁ гибриды ($2n = 2x = 8C + 8F$) и триплоидные F₁ гибриды ($2n = 3x = 16F+8C$). Такой уникальный растительный материал позволил нам изучить поведение белков и формирование рекомбинаций в бивалентах между гомеологичными хромосомами *A. fistulosum* / *A. cepa* в диплоидном F₁, и между гомологичными хромосомами *A. fistulosum* / *A. fistulosum* в триплоидном F₁ в присутствии полного гаплоидного набора *A. cepa*. Анализ бивалентов в материнских клетках пыльцы (PMCs) F₁ триплоидного гибрида показал значительный сдвиг локализации хиазм в дистальные и интерстициальные области. У F₁ диплоидного гибрида локализация хиазм была преимущественно как у *A. cepa* в дистальных 2/3 хромосом.

Мы не обнаружили отличий при сборке и разборке ASY1 и ZYP1 белков синаптономемного комплекса в PMCs между *A. cepa* и *A. fistulosum*. F₁ диплоидный гибрид показал задержку при спаривании хромосом и частичное отсутствие синапсов. Иммунодетекция мест локализации на пахитенных хромосомах белка MLH1, вовлеченного в образование рекомбинаций чувствительных к интерференции (класс I), и MUS81, нечувствительного к интерференции (класс II) показали значительную разницу в соотношении MLH1:MUS81 между *A. fistulosum* (50 %:50 %) и *A. cepa* (73 %:27 %). Соотношение MLH1:MUS81 в гомеологичных синапсах на пахитенах F₁ диплоидного гибрида (70 %:30 %) оказался наиболее сходным с таковым *A. cepa*. На пахитенах F₁ триплоидного гибрида в гомологичном синапсисе *A. fistulosum* хромосом было выявлено значительное увеличение соотношения MLH1:MUS81 (60 %:40 %) по сравнению с родительским *A. fistulosum*.

Наши исследования показали значительный сдвиг локализации мейотических рекомбинаций на хромосомах *A. fistulosum* в присутствии гаплоидного набора хромосом *A. cepa* в F₁ триплоидном гибриде, что указывает на наличие генетического контроля локализации рекомбинаций. Увеличение количества локусов MLH1 на клетку компенсировалось уменьшением количества локусов MUS81 в F₁ триплоидного гибрида, что согласуется с положением о гомеостазе событий кроссинговера. Учитывая биологическую важность и сложность кроссинговера, считаем, что контроль локализации рекомбинаций необходимо рассматривать на многих уровнях, помимо генетики, включая эпигенетику, хроматиновое окружение, пространственно-временную репликацию ДНК, распределение DSBs (double-strand breaks), влияние модификации взаимодействия белков и другие.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ проекта № 20-46-07005.

Список литературы

1. Hybrid Sterility Locus on Chromosome X Controls Meiotic Recombination Rate in Mouse / M. Balcova [et al.] // PLoS Genet. 2016. Vol. 12, N 4: e1005906.

2. Payseur B. A. Genetic Links between Recombination and Speciation // *PLoS Genet.* 2016. Vol. 12n N 6. e1006066.
3. Forejt J., Jansa P. Meiotic recognition of evolutionarily diverged homologs: Chromosomal hybrid sterility revisite // *Molecular Biology and Evolution.* 2023. N 8. msad083.
4. Factors underlying restricted crossover localization in barley meiosis / J. Higgins, K. Osman, K. G. Jones, F. Franklin // *Annu. Rev. Genet.* 2014. N 48. P. 29–47.
5. Gray S., Cohen P. E. Cohen Control of meiotic crossovers: from double-strand break formation to designation // *Annu. Rev. Genet.* 2016. Vol. 50, N 23. P. 175–210.
6. The Control of the Crossover Localization in *Allium* / N. Kudryavtseva, A. Ermolaev, A. Pivovarov, S. Simanovsky, S. Odintsov, L. Khrustaleva // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 24, N 8. 7066.
7. Rabinowitch H. D. Breeding alliaceous crops for pest resistance // *Acta Hort.* 1997. Vol. 433. P. 223–246.

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

УДК 539.1

ANTITUMOR-EFFECTORS DELIVERY TO BRAIN BY POLYMERSOMES

G. A. Becerril Aragon^{1,2}, R. Garcia Contreras²

¹*Cancer Center, Vrije Universiteit Amsterdam*

²*Facultad de Medicina, UNAM, México*

xipecc@mail.ru

Эффективность применения противораковых препаратов в опухолях головного мозга ограничена низкой проницаемостью гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). Амид MEK162, ингибитор MAPK-аз, идентифицирован как сенситизатор в облучении сфероидов U87-клеток глиомы [1]. Мы исследовали применение полимерных амфифильных нанотранспортёров, преодолевающие ГЭБ в доставке радиосенситизатора MEK162 в облученных сфероидах U87-клеток.

The delivery of anti-cancer drugs to brain tumours is hindered by the low permeability of the blood brain barrier (BBB). The amid MEK162, a MAPK inhibitor, has been identified as a radiosensitizer in multicellular U87 glioma spheroids [1]. We investigated the use of polymeric nanocarriers able to pass through the BBB for delivery of MEK162 in a spheroid model upon radiation treatment.

Introduction. Diverse biodegradable nanoplatfroms are being designed for the transport of therapeutic agents (TAs: drugs, sensitizers and detectors) to tumors. The physical properties of their nanomaterials are tailored for improving the TAs delivery and their degradation in tissue [2]. These effects are enhanced using favourable conditions of the microenvironment and external energy impulses. The radiosensitizer MEK162 is an inhibitor of mitogen activated protein kinases MEK1/2 in the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathway, which is involved in proliferation and survival of tumor cells [3]. In our experiments the hydrophobic MEK162 is transported by amphiphilic nanovesicles (polymersomes, PS) across U87-glioma spheroids. The physiological and metabolic gradients, and the cell to cell contacts in the spheroids (modal diameter = 400 nm) resemble those in tumor conditions.

Materials and methods. *In vitro model.* Spheroids of the U87VG cell line from the American Tissue Collection ATCC-HTB-14, were formed by seeding 3000 cells per well in low-attaching 96 wells–plates (Corning 3471), and incubating them for 4 days. Images were captured with a microscope DM13000, Leica. The spheroid volumes were gauged as function of time and their growth rate was defined using Scratch Assay software (DCILabs). The spheroids were radiated at 2 Gy/day dose in the Gamma-cell Excell irradiator 220 (MDS-Nordion). MEK162 (Binimetinib, Array BioPharma, W = 441,22) was added to the spheroids cultures either as a free drug (1 μ M) or loaded onto PS (10 and 50 μ M).

Polymersomes suspension (2 mg/ml). 20 mg of the block copolymer poly(butadiene)-block-poly (ethylene oxide), (PB-b-PEO PS, MW = 0.9 – 1.9 kg/mol, PolymerSource Inc) were dissolved in 10 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH= 7,4) containing 1 mM pentetic acid (DTPA). The solution was

stirred (500 rpm) during a week for PS self-assembling. The size of the PS was adjusted by extrusion through polycarbonate filters with a final cut-off membrane of 80 nm.

MEK162 loading onto PS. 10 μ l–10 mM MEK162 solution were added to 1 ml of PS suspension. The mixture was incubated and shaken 1h at room temperature. Then the free MEK162 was separated by size exclusion chromatography in *PD 10* columns packed with Sephadex *G-25M* as follows: First the column was washed with PBS and then 1 ml of MEK162 loaded-PS suspension was pipetted into it and eluted with 4 ml of PBS. The eluate was collected in fractions of 1 ml. The 4th fraction, rich in loaded PS (up to 70 %), was further used.

MEK162 leakage from PS. Leaked MEK162 was separated from loaded-PS in pre-wetted *SupelcoDSC-18* solid phase extraction columns (6 ml, 70Å packed-bed pores, *Sigma-Aldrich*). Every 10 min outflow fractions from the column (1,3 ml) were caught by the automatic collector *Frac100* (*Biotech, Pharmacia*). Then samples of 0,65 ml were frozen in Eppendorf tubes with liquid nitrogen and vacuum-dried 36 h at 0.65 mbar. The recovered MEK162–PBS pellets were kept at 4 °C. After solubilisation in *BjoWhitaker* culture medium (*Lonza*) and vortex-mixing, 20 μ l aliquots were put in round-bottom 96-wells plates, filled with 80 μ l acetonitrile and centrifuged 10 min at 2000 g. The supernatants (100 μ l) were transferred in polypropylene conical plates to the HPLC (*Ultimate 3000, Dionex*)-tandem-MS (*ABSciex – Qtrap 5000, Applied Biosystems*) for MEK162 quantification. The used software has been described by Honeywell R. et al. [4].

Results: Aiming at elucidate the biological effects of MEK162 on U87-spheroids, the concentration levels of the product of kinases MEK1/2, the phosphorylated protein pERK, which is an indicator of the tumorigenic potential of the Ras/Raf/MEiC/ERK signalling pathway, and the level of γ H2AX, a double strand breaks marker, were determined by Western-blotting. The low levels of pERK 24 hours after the addition of MEK162-loaded PS (10 and 50 μ M) to the spheroid cultures, showed that ERK phosphorylation was inhibited, and the high γ H2AX levels indicated radioinduced DNA damage at both MEK162- loaded PS concentrations.

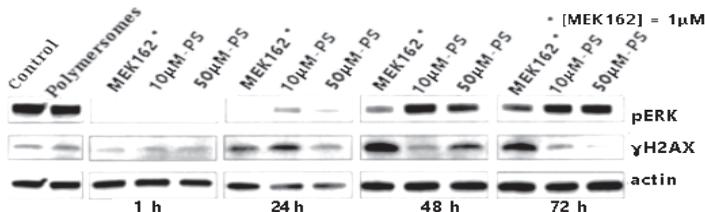


Figure 1. Western immunoblotting on pERK and γ H2AZ levels was performed 1,24,48,72 h after the irradiation of spheroids. The proteins were stained with CST Inc. antibodies. The spheroid cultures were treated either with free MEK162 (1 μ M) or MEK-162 loaded onto the PS (10 μ M and 50 μ M) one hour before irradiation (2Gy/day)

The dynamics of pERK through the experiment suggests that ERK phosphorylation is longer inhibited by free MEK162 than by MEK162 loaded in PS (see Figure 1). There was a difference in the time taken for recovery significant pERK levels: while in the spheroids under the action of 10 μM MEK162-loaded PS it occurred 48 after the beginning of the experiment, for 50 μM MEK162-loaded PS it happened after 72 h. However pERK levels in spheroids under the action of free MEK162 also trend to grow so that more comprehensive dynamics would require longer terms of assessment. At that point, we hypothesised that this apparent loss of inhibition power could be a consequence of a leakage of MEK162 from PS during migration to the target cells. Next we tried to find out whether this potential MEK162 leakage from loaded-PS in suspension actually occurs.

MEK162 leakage from PS. The use of nanocarriers with maximal loading capacity and minimal load leakage would be highly efficient and less toxic in cancer therapy. MEK162 is a hydrophobic molecule which gets absorbed onto the PS bilayer, which in PB-b-PEO PS has a thickness of 7 nm [5]. Figure 2. shows MEK162 content in outflow-fractions from MEK162 loaded-PS collected every 10 min in solid phase extraction columns. PEGylated PS are stabilised and do not degrade, so that they are insoluble before reaching their target cells. The detected MEK162 leakage from PS tended to be larger at time points just after the manual refilling of the extraction column with PBS, including the initial (10 min) measurement. This experimental artefact could be avoided implementing continuous medium refilling. The detected total MEK162 leaked mass from PS after 220 min at room temperature was $551 \pm 66,23$ ng, what constitutes $1,80 \pm 0,17$ % of the initial MEK162 content in the analysed 1 ml of 70 μM MEK162 loaded PS suspension (30,88 μg). However, for full description of MEK162 leakage it is required to vary external physical conditions (T, pH) and chemical conjugation of PS.

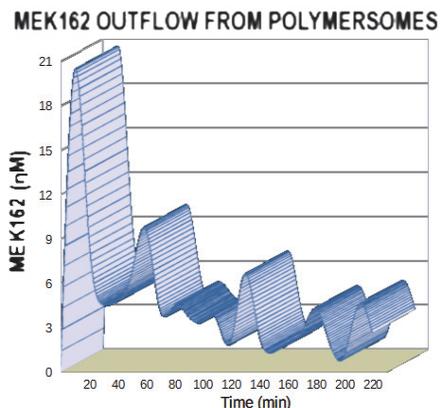


Figure 2. MEK-162 outflow from the loaded-polymersomes solution as determined by HPLC and MS in the collected fractions from the separation column (in PBS at room temperature)

Conclusions. The amid MEK162 inhibits MEK1/2 activity and enhances radiation effects in U87–glioma spheroids either administered free or loaded onto PB-b-PEO polymersomes. The magnitude MEK162 leakage from loaded PS in our experimental conditions was small: $1,80 \pm 0,17$ % of the initial MEK162 content and confirms the prospective of the use of PB–b-PEO PS in brain tumor therapy research.

References

1. Narayan R.S., Gasol A, Slangen P.L.G, Cornelissen F.M.G., Lagerweij T., Veldman H., Dik R, van den Berg J., Slotman B. J., Würdinger T., Haas-Kogan D. A., Stalpers L.J.A., Baumert B.G., Westerman B.A., Theys J., Sminia P. Identification of MEK162 as a Radiosensitizer for the Treatment of Glioblastoma. *Molecular Cancer Therapy Focus*, 2018, vol. 2, pp. 347–354.
2. Becerril Aragon G.A., Slotman B.J., Sminia P. Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Agents to Brain Tumours. *Novel molecular oncotargets and Nano-oncotherapeutics*, Cambridge Scholars, Newcastle, 2023, chapter 12, pp. 579–619.
3. Bikhezar F., de Kruijff R.M., van der Meer A.J.G.M., Becerril Aragon G., Garcia A.G., Slotman B.J., Narayan R.S., de Vries E., Denkova A.G., Smina P. Preclinical Evaluation of Binimetinib (MEK162) Delivered via Polymeric Nanocarriers in Combination with Radiation and Temozolomide in Glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 2020, no. 146 (2), pp. 239–246.
4. Honeywell R. Simple and selective method for the determination of various tyrosine kinase inhibitors used in the clinical setting by liquid chromatography tandem mass spectrometry/ Honeywell R., Yarzadah E., Giovannetti N. *Journal of Chromatography B*, 2010. N 878. P. 1059–1068.
5. Shamay Y., Elkabets M., Li H., Shah J., Brook S., Wang F., Adler K., Baut E., Scaltriti M., Jena P.V., Gardner E.E., Poirier J.T., Rudin C.M., Baselga J., Haimovitz-Friedman A., Heller D. A P-selectin is a nanotherapeutic delivery target in the tumor microenvironment. *Science Translational Medicine*, 2016, no. 8, pp. 345ra87–345ra87.

УДК 578.7

BACTERIOPHAGE APPLICATIONS BEYOND PHAGE THERAPY

R. García Contreras

*Department of Microbiology and Parasitology Faculty of Medicine UNAM,
Mexico City, Mexico
rgarc@bq.unam.mx*

Bacteriophages are viruses that infect bacteria and are the most abundant biological entity of the planet, surpassing bacteria by a factor of 10 and play a fundamental role in bacterial ecology. They can either be lytic or lysogenic (temperate) being the first ones only able to replicate and lyse their bacterial hosts, while the second type integrate their genome in the host genome and replicate each time the infected bacteria replicates. Since the early 20th century, phages had been used for the treatment of bacterial infections, in plants, animals and humans, these treatments are known as phage therapy and had been developed in some counties of Western Europe, used to treat several kinds of infections. Besides the ample possibilities of phage therapy, these viruses have many currently in use and potential applications, among them reversing antibiotic resistance, reduction of bacterial virulence, treatment of dysbiosis, pest control, surface disinfection and even to combat global warming [1]. In my talk I will discuss some of these applications and present experimental data of our laboratory and other groups in the strategies for decreasing bacterial virulence and antibiotic resistance of important bacterial pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*.

References

1. García-Cruz J.C., Huelgas-Méndez D., Jiménez-Zúñiga J.S., Rebolgar-Juárez X., Hernández-Garnica M., Fernández-Presas A.M., Husain F.M., Alenazy R., Alqasmi M., Albalawi T., Alam P., García-Contreras R. Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy. *Peer J.*, 2023, vo. 11, e15272. DOI: 10.7717/peerj.15272.PMID:37101788;PMCID:PMC10124553.

УДК 577.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ РЕКОМБИНАЦИИ В ОБЛАСТИ CRISPR-CAS ЛОКУСОВ В ГЕНОМАХ *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA* SEROVAR THYPHIMURIUM ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ

Н. А. Арефьева^{1,2,3}, Ю. С. Букин^{1,4}, С. В. Эрдынеев²

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²Иркутский государственный медицинский университет Минздрава РФ, г. Иркутск, Россия

³Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

⁴Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

arefieva.n4@gmail.com

The search and verification of recombination processes in the CRISPR-*cas* loci area of *Salmonella enterica* subs. *enterica* serovar Thyphimurium were performed. The verified recombination event which was detected in *cas3* and *cse1* genes region occurred between strains Wartortle (donor) and FORC50 (acceptor). But it's more probable that the true donor was the ancestor of the strain Wartortle.

Введение. Среди шести подвидов *Salmonella enterica* подвид *Enterica* ответственен за более чем 99 % пищевых инфекций человека, вызываемых сальмонеллами. В настоящее время известно около 2600 серовариантов данного подвида, среди которых серовар Thyphimurium имеет наиболее широкий круг хозяев [2]. Лечение инфекций, вызываемых сальмонеллами, бывает затруднено в связи с появлением у данного патогена устойчивости к антибиотикам. Одним из перспективных способов борьбы с патогенными бактериями является фаготерапия, однако бактерии также способны приобретать устойчивость к фаговым препаратом посредством иммунной системы CRISPR-Cas. Для разработки и повышения эффективности фаготерапии против *S. enterica* необходимо изучить особенности функционирования и эволюции CRISPR-Cas систем. Обмен генетическим материалом посредством рекомбинации играет важную роль в эволюции бактерий [1]. Исследование процессов рекомбинации в области CRISPR-*cas* локусов позволит выявить возможность приобретения у *S. enterica* устойчивости к фагам посредством горизонтального переноса и определить горячие точки рекомбинации.

Материалы и методы. Объектом для поиска и верификации участков рекомбинации в CRISPR-*cas* локусе являлись 109 геномов *S. enterica* subs. *enterica* serovar Thyphimurium из базы данных NCBI GenBank, в которых присутствовали локусы CRISPR-Cas систем. Согласно базе данных CRISPRCasdb все CRISPR-*cas* локусы *S. enterica* относятся к подтипу I-E.

Скачанные геномы были реаннотированы при помощи конвейера для аннотации прокариотических геномов NCBI PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline). Аннотированные последовательности рамок считывания генов *cas3*, *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1*, *cas2* были извлечены из всех геномов и транскрипированы в белковые последовательности. Выравнивание нуклеотидных после-

довательностей *cas*-генов с учетом позиции кодона (1+2, 3) было проведено с помощью программ MAFFT7 и RevTrans 2.0. Выровненные с учетом позиции кодона *cas*-гены были сконкатенированы в одну последовательность для каждого генома в соответствии с порядком их расположения в CRISPR-*cas* локусе. Полученное выравнивание кодирующей части CRISPR-*cas* локуса было проанализировано на наличие событий рекомбинации при помощи алгоритмов программы RDP5 (RDP, Geneconv, Bootscan, Chimaera, Bootscan, SisScan). Для верификации событий рекомбинации в области CRISPR-*cas* локуса был написан скрипт на языке программирования R, который работает с выравниванием кодирующей части с учетом позиции кодона. Данный скрипт позволяет проверить, являются ли найденные программами предполагаемые участки рекомбинации истинными, или их сходство в разных геномах появилось в результате других эволюционных процессов.

Результаты. При помощи алгоритмов RDP5 было найдено 145 предполагаемых участков рекомбинации. Разработанный алгоритм верификации идентифицировал только одно событие рекомбинации как истинное. Данное событие произошло между штаммами *S. enterica* subs. *enterica* serovar Thyphimurium Wartortle (донор участка) и FORC50 (акцептор участка) в области генов *cas3* и *cse1* (рис. 1). Точки рекомбинации расположены по координатам 98 п. о. и 4006 п. о. от начала выравнивания. Так как в соответствии с датами изоляции штаммов Wartortle (19.12.2017) и FORC50 (01.01.2016), указанными на странице штаммов в базе данных NCBI NT, штамм донора младше штамма акцептора, вероятно истинным донором рекомбинантного участка был предок штамма Wartortle. Также возможно, что первичным акцептором был предок штамма FORC50. Для получения более точной информации необходимо провести исследование на большей выборке штаммов *S. enterica*.

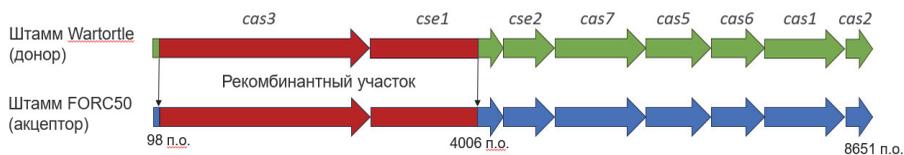


Рис. 1. Событие рекомбинации между штаммами *S. enterica* subs. *enterica* serovar Thyphimurium Wartortle и FORC50

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-25-00520.

Список литературы

1. Didelot X, Maiden MC. Impact of recombination on bacterial evolution // Trends Microbiol. 2010. Vol. 18, N 7. P. 315–322.
2. Salmonella enterica subsp. enterica virulence potential can be linked to higher survival within a dynamic in vitro human gastrointestinal model / C. Caverstri [et al.] // Food Microbiol. 2022. Vol. 101. P. 103877.

УДК 616-006.81.04:[57.085.23+577.21+612.017.1]

РАЗРАБОТКА ЛЕНТИВИРУСНОЙ ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ И ПРЕЗЕНТАЦИИ МЕЛАНОМНОГО АНТИГЕНА MLANA В ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

И. А. Бадалян¹, Н. Г. Антонец¹, И. С. Трусов², В. В. Гринев^{1,2},
А. Е. Гончаров¹

¹ Государственное научное учреждение «Институт биофизики и клеточной инженерии
Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Беларусь

² Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

irina1512.37533@gmail.com

Lentivirus-based vectors encoding two engineered melanoma associated MLANA proteins, named MLANA-FLAG[®] and MLANA-FLAG[®]-LAMP1, were developed and tested. These new vectors can be used for lentiviral transduction of dendritic cells and the creation of new cell therapies for human melanoma.

Введение. Меланома – это злокачественное новообразование кожи, формирующееся из трансформированных меланоцитов. По данным ВОЗ, заболеваемость меланомой кожи за последние 50 лет возросла в 7 раз, ежегодно во всем мире регистрируется свыше 300 тысяч случаев заболевания меланомой [3]. Классическая триада – хирургическое, химиотерапевтическое и радиолучевое лечение, – зачастую оказывается малоэффективной в лечении меланомы. Инновационным подходом лечения меланомы считается использование генетически модифицированных дендритных клеток, длительно представляющих опухолеассоциированные и/или опухолеспецифические белки. Среди опухолеассоциированных белков меланомы особое внимание привлекает белок MLANA (MART1; антиген, связанный с меланомой, распознаваемый Т-клетками), который сверхэкспрессируется в меланоцитах при злокачественной трансформации [1; 2]. Соответственно, целью данного исследования явилась разработка лентивирусной векторной системы для эктопической экспрессии и презентации меланомного антигена MLANA в дендритных клетках человека.

Материалы и методы. В работе использованы плазмиды pUC57, кодирующие разработанные варианты белка MLANA, лентивирусный вектор экспрессии pHR-SINcPPT-SIEW, вектор упаковки pCMV-dR8.91, вектор оболочки pMD2. G, линия клеток НЕК 293Т, а также бактериальный штамм *E. coli DH5α*. Трансформацию бактерий *E. coli DH5α* плазмидной ДНК осуществляли кальциевым методом. Эндонуклеазы рестрикции SgsI и BamHI (Thermo Fisher Scientific, США) использовались для подготовки нуклеотидных последовательностей для последующего клонирования. Очистку плазмид для ко-трансфекции проводили с помощью набора EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen, США).

Мононуклеары периферической крови выделяли путем центрифугирования крови, наложенной на раствор фиколл-пака с плотностью 1,077 г/л. Моно-

циты получали методом адгезии, дифференцировку моноцитов в дендритные клетки проводили в течение 4 сут в среде RPMI-1640, содержащей 1,5 % АВ-сыворотки человека и 100 нг/мл ГМ-КСФ и 50 нг/мл ИЛ-4 (5 % CO₂, +37 °C).

Ко-трансфекцию клеток линии НЕК 293Т осуществляли с помощью полиэтиленimina: к смеси векторов экспрессии, упаковки и оболочки, взятых в соотношении 3:2:1 по массе, добавляли полиэтиленимин в массовом соотношении 3:1 с плазмидной ДНК, через 24 ч. меняли ростовую среду на свежую, сбор рекомбинантных псевдотипированных лентивирусов осуществляли через 48–72 ч после ко-трансфекции. Концентрирование вирусных частиц проводили методом ультрацентрифугирования при 120000 г, 120 мин, +4 °C.

Трансдукцию клеток проводили методом спинокуляции (1500 г, 2 ч, +32 °C) с добавлением 5–8 мкг/мл Polybrene®. Через 48–72 ч после трансдукции клетки фенотипировали методом проточной цитометрии на приборах Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, США) и FlowSight (Luminex corp., США) с использованием антител к MLANA, LAMP1 и FLAG®. Общую эффективность трансдукции оценивали по экспрессии флуоресцентного белка eGFP.

Результаты. Ген *MLANA* (*Melan-A*, *MART-1*, *MART1*) локализован в сегменте 9p24.1 хромосомы 9 человека с координатами chr9:5890889–5910606. Нами проведен систематический биоинформатический анализ транскриптомных данных, полученных по технологии RNA-Seq, для уточнения структуры и глобального профиля экспрессии гена *MLANA* в клетках человека. Результаты проведенного анализа указывают на то, что экспрессия этого гена может приводить к образованию в клетках пяти основных изоформ РНК. При этом три изоформы (депонированные в базе Ensembl под идентификационными номерами ENST00000381477, ENST00000381476 и ENST00000381471) являются матричными РНК и имеют высокую степень подтвержденности, а вот две другие изоформы (ENST00000482341 и ENST00000490518 по базе Ensembl) могут быть классифицированы как некодирующие и имеют низкий уровень подтверждения. Разнообразие изоформ РНК гена *MLANA* формируется за счет использования альтернативных точек начала и терминации транскрипции, а также альтернативного сплайсинга 5'-концевой области первичных РНК. Структура открытой рамки считывания (ORF) при этом не меняется, что определяет существование у гена *MLANA* одной консенсусной последовательности CCDS6466.1, кодирующей единственную изоформу белка MLANA.

Описанные выше результаты легли в основу дизайна транскрибируемой части экспрессионных кассет, кодирующих два варианта инженерного белка MLANA: 1) белок MLANA-FLAG® с С-концевым 8-аминокислотным ярлыком FLAG® (DYKDDDDK), предназначенным для мониторинга экспрессии целевого белка с помощью универсальных анти-FLAG® антител; 2) гибридный белок MLANA-FLAG®-LAMP1, где кроме ярлыка FLAG® добавлен цитоплазматический и трансмембранный домены от белка LAMP1 для лизосомальной компартментализации целевого белка. Кодированные последовательности вместе с 5'UTR транскрипта ENST00000381477 были клонированы по сайтам SgsI и BamHI в лентивирусный вектор экспрессии 2-го поколения pHR-SINcPPT-SIEW.

Согласно разработанному дизайну, целевые фрагменты были клонированы в вектор pHR-SINcPPT-SIEW таким образом, чтобы расположиться сразу же за промотором P_{SPFFV} от фокусообразующего вируса селезенки, но перед IRES и репортерным геном eGFP. Корректность структуры полученных рекомбинантных векторов на основе pHR-SINcPPT-SIEW (названных pHR'-MLANA-FLAG[®] и pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1, по структуре кодируемых инженерных белков) была подтверждена ПЦР и рестрикционным анализом.

Как и ожидалось, рекомбинантные лентивирусы, продуцируемые клетками НЕК 293Т после ко-трансфекции последних одним из разработанных векторов экспрессии совместно с пакующим вектором pCMV-dR8.91 и вектором оболочки pMD2. G, способны переносить генетическую конструкцию в разные типы клеток человека, но с разной эффективностью: прогнозируемо наиболее чувствительными к лентивирусной трансдукции оказались сами клетки НЕК 293Т. При этом транскрипционная/трансляционная активность сконструированных нами последовательностей может быть подтверждена методами флуоресцентной конфокальной микроскопии и проточной цитометрии не только по флуоресценции белка eGFP, но и по появлению в генетически модифицированных клетках инженерных белков MLANA-FLAG[®] и MLANA-FLAG[®]-LAMP1, распознаваемых специфическими антителами.

Заключение. Получены и испытаны лентивирусные векторы экспрессии, кодирующие два инженерных варианта белка MLANA, названных MLANA-FLAG[®] и MLANA-FLAG[®]-LAMP1. Созданные генетические конструкции могут быть использованы для генетической модификации дендритных клеток и разработки новых методов клеточной терапии меланомы.

Список литературы

1. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with a MART-1 adenovirus / L. H. Butterfield [et al.] // J. Immunol. 1998. Vol. 161. P. 5607–5613.
2. Dannull J., Haley N. R., Archer G. Melanoma immunotherapy using mature DCs expressing the constitutive proteasome // J. Clin. Invest. 2013. Vol. 123. P. 3135–3145.
3. Skin cancer statistics. URL: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/skin-cancer-statistics>.

УДК 576.3

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ СУРФЕАКТОМА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В РАСПОЗНАВАНИИ ИХ КЛЕТКОЙ-МИШЕНЬЮ

Д. Е. Баландин, М. С. Арбатский, А. В. Чуров

*РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России,
Обособленное структурное подразделение
«Российский геронтологический научно-клинический центр»,
Институт изучения старения, г. Москва, Россия
d. balandin01@yandex.ru*

Extracellular vesicles (EV) participate in intercellular communication and have a regenerative effect on recipient cells. The biodistribution of EV depends on the composition of proteins, lipids and carbohydrates on the surface of EV. In this regard, the biodistribution model can help to study the effectiveness of the regenerative effects of EV.

Внеклеточные везикулы (ВВ) считаются наиболее значимыми компонентами секрета мезенхимных стромальных клеток (МСК). ВВ несут набор белков, биоактивных липидов, нуклеиновых кислот, защищенных липидным бислоем и демонстрируют стойкие регенеративные эффекты при поглощении клетками-мишенями. Однако многие исследователи показывают, что и другие компоненты кондиционированной среды, кроме ВВ, также участвуют в функции МСК. Таким образом, для выяснения механизмов регенеративных эффектов МСК важно оценить вклад ВВ в эти процессы.

ВВ участвуют в межклеточной коммуникации, передавая от одной клетки к другой белки, биоактивные липиды и нуклеиновые кислоты. ВВ, продуцируемые стволовыми клетками, могут доставлять клеткам-мишеням важную информацию для регенерации тканей после повреждения [1].

В подавляющем большинстве статей, изученных при написании этого тезиса, раскрыты схожие вопросы, такие как биогенез везикул, их содержимое, классификация по размеру, участие в межклеточном взаимодействии. Также, достаточно подробно рассмотрены вопросы слияния лиганд-рецепторного взаимодействия везикул с клеткой-реципиентом. Лишь в нескольких статьях упоминается о специфичности взаимодействия везикул с клетками. Однако при рассмотрении приведенных примеров можно заметить, что в конечном итоге подробное описание механизма распознавания везикулы клеткой сводится к описанию взаимодействия лиганд-рецепторных пар.

Поднимая вопрос специфичности взаимодействия везикул с клетками, мы решили подробно изучить лиганд-рецепторные пары, упоминаемые в большинстве статей. Возможно, специфичность взаимодействия везикулы с клетками/тканями определяется не их биогенезом, составом мембран и внутренним составом, а всего лишь особым электростатическим полем ткани, привлекающим везикулы с соответствующими характеристиками заряда [2–4]. Исходя из этого, можно предположить, что специфичности, как таковой не существует, а существует объемное распределение разнозаряженных везикул в электростатическом поле тканей [5].

Для ответа на вопрос о возможности распределения везикул необходимо подготовить обучающую и тестовую (валидационную) выборки. Для анализа будут использоваться табличные данные, где объектом для каждой записи будет молекулярный компонент мембраны внеклеточной везикулы, а атрибутом – место ее распределения, подтвержденное открытыми данными, и количество атрибутов может варьироваться для каждого объекта. Сбор данных осложняется отсутствием готовых массивов. Таблица формируется вручную из объема заранее подготовленной выборки литературы по данной тематике.

Для непосредственного обучения модели обучающая выборка, будет включать в себя все случаи предсказания распределения на знаниях об электрофоретической подвижности частиц в заряженном поле и электростатических эффектах. Для проверки точности модели и контроля переобучения модели тестовая выборка будет состоять из экспериментально подтвержденных примеров распределения везикул.

Следующим этапом является определение наиболее подходящего алгоритма машинного обучения. После изучения публикаций, посвященных подобным задачам, было решено использовать алгоритм машинного обучения Random Forest, как наиболее подходящего для решения данного типа задач. Планируется использовать архитектуру случайного леса, где каждое дерево, в качестве критерия качества ветвления дерева имеет индекс Gini, глубину каждого дерева будем считать гиперпараметром, оптимум которого подберем с помощью ранней остановки, ограничением глубины дерева, заданием минимального допустимого числа или отсечением ветвей.

Исследовать данные перед обучением, проверять наличие связи между целевым показателем и признаками объектов, оценивать природу и качество данных, а также интерпретировать результат работы случайного леса будем с помощью метода Exploratory Data Analysis (EDA) и для этого в Python будем использовать библиотеку SHAP (SHapley Additive exPlanations). Это позволит нам выявить наиболее значимые признаки датасета.

После получения модели будут проверены имеющиеся данные о составе внеклеточных везикул МСК, культивируемых в лаборатории. Результат предсказания будет затем проверяться экспериментально.

Список литературы

1. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential / T. Lopatina, S. Bruno, C. Tetta, N. Kalinina, M. Porta, G. Camussi // *Cell Communication and Signaling*. 2014. N 12. P. 1–12.
2. McKee T. J. et al. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis // *Scientific reports*. 2019. Vol. 9, N 1. P. 1–15.
3. Stylianopoulos T. et al. Diffusion of particles in the extracellular matrix: the effect of repulsive electrostatic interactions // *Biophysical journal*. 2010. Vol. 99, N 5. P. 1342–1349.
4. Halper J., Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins // *Progress in heritable soft connective tissue diseases*. 2014. P. 31–47.
5. Lieleg O., Baumgärtel R. M., Bausch A. R. Selective filtering of particles by the extracellular matrix: an electrostatic bandpass // *Biophysical journal*. 2009. Vol. 97, N 6. P. 1569–1577.

УДК 616-092.4

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ПОПУЛЯЦИИ ПРОФИБРОТИЧЕСКИХ АКТИВИРОВАННЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК

**Н. А. Басалова, О. А. Григорьева, У. Д. Дьячкова, М. А. Виговский,
М. А. Кулебякина, М. С. Арбатский, А. Ю. Ефименко**

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия
basalovana@my.msu.ru*

Activated stromal cells are a promising target for the treatment of fibrotic diseases. In this work, potential markers of activated cells, NTM, CHD3, and RDH10, were identified using bioinformatic analysis of the single cells transcriptome. The data were validated by RT-PCR, ICC and IHC.

Развитие фиброза органов и тканей представляет собой сложный процесс, включающий взаимодействие между множеством различных типов клеток, ввиду чего поиск терапевтических агентов для борьбы с ним является непростой задачей. На протяжении длительного времени ключевым типом клеток, опосредующим развитие фиброза и являющимся основной мишенью для терапии фибротических заболеваний, считались миофибробласты. Однако предложенные на сегодняшний день стратегии, направленные на ингибирование функций миофибробластов или элиминацию их из тканей, не показали достаточной эффективности в клинической практике. Поэтому в настоящее время пристальное внимание уделяется поиску новых клеточных мишеней, воздействие на которые может более эффективно способствовать разрешению фиброза. Активированные предшественники миофибробластов, способные к быстрой пролиферации и инвазивному росту, и миграции в здоровые участки ткани представляются такой популяцией, за счёт их высокой восприимчивости к ростовым факторам и другим регуляторным сигналам. Выявление новых маркеров данной субпопуляции позволит не только эффективно выявлять их в тканях, но и предложить новые молекулярные механизмы воздействия на фибротические процессы.

Для решения этой задачи нами было проведено высокопроизводительное РНК-секвенирование единичных клеток (scRNA-seq) образцов контрольных мезенхимных стромальных клеток (МСК), а также МСК, культивируемых в профибротическом микроокружении (децеллюляризованный внеклеточный матрикс от фибробластов + TGF β) или в условиях адипогенной дифференцировки в качестве известного антифибротического стимула ($n = 2$). Из полученных массивов данных нами были выбраны дифференциально экспрессирующиеся гены, имеющие разнонаправленный паттерн экспрессии в профибротических и адипогенных условиях, как относительно друг друга, так и относительно контрольной группы.

Число экспрессирующихся в профибротических, но подавляемых в условиях адипогенной дифференцировки генов составило 729, 63 из них были изме-

нены более чем в 1,5 раза. Количество подавленных в профибротических условиях, но повышающихся при адипогенных условиях генов составило 755, 55 из которых изменились более чем в 1,5 раза в обеих выборках. Списки были сокращены до 9 (COL8A1, FN1, PRICKLE1, NTM, UCHL1, CHD3, VCAN, MEG3, RDH10) и 3 (PLIN2, PDLIM1, MT1X) генов соответственно, ввиду сопоставленного паттерна изменения в обоих повторах.

Полученные данные были валидированы методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Мы показали для всех генов первой группы достоверное снижение экспрессии при адипогенной индукции по сравнению с контролем. Кроме того, для генов NTM, RDH10, VCAN, PRICKLE1 и UCHL1 была показана значительно отличающаяся экспрессия в МСК при адипогенной индукции по сравнению с клетками, культивированными в профибротических условиях.

На основе полученных результатов и по литературным данным были выбраны наиболее перспективные мишени для активированных фибробластов – NTM, CHD3, и RDH10. При валидации полученных данных методом иммуноцитохимического анализа (ИЦХ) мы показали, что в профибротических условиях в популяции МСК увеличивается число клеток с экспрессией CHD3 в ядре, а также количество клеток, несущих на своей поверхности кластеры NTM, что может говорить об активации сигнальных путей данного белка. В то же время вопреки данным ПЦР клетки, экспрессирующие RDH10, не были найдены в профиброгенных условиях, а обнаруживались только при индукции адипогенной дифференцировки.

Схожие результаты были обнаружены при иммуногистохимическом анализе (ИГХ) тканей лёгких мыши с индуцированным блеомицином фиброзом. Для всех белков мы обнаружили рост уровня белка в тканях легкого, поврежденного блеомицином, на 28-е сут при развивающемся фиброзе. При оценке со-локализации с маркером миофибробластов (альфа гладкомышечным актином, α SMA) мы обнаружили, что лишь небольшая часть клеток легкого коэкспрессировала α SMA и NTM/CHD3/ RDH10. В то же время следует отметить, что большинство положительных по данным маркерам клеток находились в основном по периферии зон активного увеличения соединительной ткани – фибротических фокусов, богатых α SMA.

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет предположить, что выявленные в ходе биоинформатического анализа РНК-секвенирования единичных клеток гены NTM, CHD3 и RDH10 действительно могут быть рассмотрены как маркеры активированного состояния стромальных клеток. Однако более глубокое изучение функции клеток, несущих данные маркеры, необходимо для выявления их роли в регуляции развития фиброза.

Исследование выполнено за счет грантов РФФИ № 21–315–70002 (ПЦР в реальном времени, ИЦХ, биоинформатический анализ) и РФФИ № 23–15–00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/> (ИГХ, ИГХ-анализ).

УДК 579.61:615.339:616.98

АНАЛИЗ СТРУКТУР CRISPR/CAS СИСТЕМ В ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* КАК ОСНОВА СОЗДАНИЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ ФАГОТЕРАПИИ

В. В. Бединская, Л. А. Степаненко, Е. В. Симонова, В. И. Злобин

*Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия
vika-2801@mail.ru*

The paper presents an analysis of the structures of CRISPR/Cas systems of genome-wide sequences of *Pseudomonas aeruginosa* strains and screening of phages through the spacer sequences of their CRISPR cassettes. The characteristics of CRISPR loci and groups of Cas genes that determined the type of CRISPR/Cas systems are given. Bacteriophages were screened using spacer sequences of CRISPR cassettes, indicating their accession number in NCBI.

В медицинской практике возрастает интерес к применению бактериофагов для лечения инфекций бактериального происхождения. Рассмотрены новые подходы к селекции бактериофагов как средства защиты от патогенной флоры путем изучения структур систем CRISPR/Cas, лежащих в основе механизмов взаимодействия фагов и бактерий. Система CRISPR-Cas была открыта как форма адаптивных системы иммунитета у бактерий и архей для защиты от вторжения вирусной или фаговой ДНК [1–3].

Цель. Провести анализ структур CRISPR/CAS систем в полногеномных последовательностях *Pseudomonas aeruginosa* для определения их устойчивости к бактериофагам.

Материалы и методы. Была проанализирована база данных NCBI. В качестве объекта взяты все полногеномные последовательности *Pseudomonas aeruginosa* (359 штаммов). Из них у 184 в обнаружены CRISPR /Cas системы. Для поиска CRISPR-локусов и Cas-генов использовались онлайн-приложения CRISPROne и CRISPRDetect. Для поиска фагов – онлайн-приложение CRISPRTarget».

Результаты и обсуждение. При анализе установлено, что в 16,3 % случаев штаммы *Pseudomonas aeruginosa* выделены из мокроты, в 8,1 % из мочи и в 6,0 % из крови. При помощи нескольких алгоритмов поиска в CRISPR/Cas системах исследуемых штаммов в 10,3 % случаев определено наличие одной CRISPR-кассеты, в 31,5 % – две, в 45,1 % – три, в 11,4 % –четыре и в 1,6 % – пять. Рядом с кассетами был идентифицирован набор Cas-генов, характерный для систем Type-I Subtype-I- F (cas1, cas3, cas8f, cas5f, cas7f, cas6f), Subtype-I-E (cas3, cas8, cse2, cas7, cas5, cas6, cas1, cas2), Subtyp-I-C (cas2, cas1,cas4, cas7, cas8c, cas5, cas3), что свидетельствует о функциональной активности кассет. Анализ спейсерного состава показал, что их количество в кассетах составило от 3 до 52. Совокупное количество выявленных спейсеров 3768. Их разнообразие составило 2380. Из них 1076 спейсеров повторялись в одной или нескольких кассетах. Последовательность консенсусных повторов в найденных CRISPR-

кассетах была стабильна и представлена тремя вариантами, размером в 26–30 н. о. В ходе исследования определены штаммы с аналогичным спейсерным составом. Филогенетический анализ данных штаммов позволил определить их происхождение. Скрининг спейсерных последовательностей выявил их соответствие протоспейсерам фагов бактерий семейства *Pseudomonadaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Gordoniaceae*, *Streptomycetaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Gordoniaceae*, *Halobacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Erwiniaceae*. Анализ спейсерного состава кассет показал соответствие участка одного спейсера протоспейсерам нескольких фагов, а также соответствие нескольких спейсеров в одной кассете протоспейсерам одного и того же фага. Это может свидетельствовать о лабильности антифагоцитарной защиты бактерий. Анализ структур CRISPR/CAS систем в полногеномных последовательностях *Pseudomonas aeruginosa* позволил получить информацию об их функциональных и структурных особенностях, и о бактериофагах против которых направлено ее действие. Данный подход в дальнейшем может быть использован как платформа для создания персонализированной фаготерапии.

Список литературы

1. Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases / S. S. Wu, Q. C. Li, C. Q. Yin, W. Xue, C. Q. Song // *Theranostics*. 2020. Vol. 10, N 10. P. 4374–4382. <https://doi.org/10.7150/thno.43360>
2. Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective / D. Zhang, A. Hussain, H. Manghwar, K. Xie, S. Xie, S. Zhao, R. M. Larkin, P. Qing, S. Jin, F. Ding // *Plant Biotechnology Journal*. 2020. Vol. 8, N 18. P. 1651–1669. <https://doi.org/10.1111/pbi.13383>
3. Application of the CRISPR/Cas System in Pathogen Detection / B. Yuan, C. Yuan, L. Li, M. Long, Z. Chen // *Molecules*. 2022. Vol. 20, N 27. P. 2–15 <https://doi.org/10.3390/molecules27206999>

УДК 575.112

УНИКАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ И РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОТЛИЧИЯ ВИРУСА SARS-COV-2 В ПРИМОРСКОМ КРАЕ В 2020–2023 ГОДАХ

**А. А. Белик, Л. М. Семейкина, Е. В. Персиянова, Ю. А. Белов,
Н. В. Крылова, М. Ю. Щелканов**

*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора,
г. Владивосток, Россия
belik_a_a@mail.ru*

The investigations of whole genome sequences of SARS-CoV-2 isolates from Primorsky region revealed some unique mutations in structural and non-structural proteins, showing the conservation of virus functional activity. There was also shown a difference between the share of XBB.1.5 and XBB.1.9 subvariants in Primorsky region and whole Russia in the spring of 2023, making the distribution of subvariants here close to that in South Korea.

Пандемия COVID-19, продолжавшаяся, по данным ВОЗ, с 11 марта 2020 г. по 5 мая 2023 г., оставила глубокий след в истории науки и медицины. Полученные за этот период данные по структуре, распространению и мутациям вируса SARS-CoV-2 открывают возможности для создания противовирусных препаратов нового типа. Геном исходного штамма вируса SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (EPI_ISL_402124) насчитывает 29 903 пар оснований и содержит 13 генов и кодирует 37 белков, из которых 4 структурных, 7 ферментов и 26 неструктурных белков, так или иначе вовлеченных в процесс репликации вируса и связывания его с клеткой хозяина. Среди генетических линий вируса SARS-CoV-2, циркулировавших на территории Приморского края в течение пандемии, можно выделить: совокупность ранних геновариантов (март 2020 – июнь 2021 г.), относительно консервативный вариант дельта (июль 2021 – январь 2022 г.) и вариант омикрон, характеризующийся нарастающим количеством мутаций и субвариантов: BA.1 – с января 2022 г., BA.2 – с февраля 2022 г., BA.5 – с июля 2022 г., XBB – с февраля 2023 г.

Цель исследования заключалась в том, чтобы понять, в какой степени эволюция вируса SARS-CoV-2 в Приморском крае являлась внутренним процессом, а в какой – следствием проникновения в регион новых вариантов извне.

В ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Роспотребнадзора из образцов назофарингеальных смывов, изолированных от жителей Приморского края в 2020–2023 гг., была секвенирована 351 полногеномная последовательность вируса SARS-CoV-2. Секвенирование производилось на приборе MinION (Oxford Nanopore Technologies).

Было показано, что первый зарегистрированный в крае образец варианта омикрон имел в папаин-подобной протеазе не только характерные для представителей субварианта BA.1 делецию S1265del и замену L1266I, но и делецию I205del и замену E206K. Начиная с сублинии BA.2 данные делеции исчезают.

У всех образцов, принадлежащих варианту омикрон, в белке вирусной оболочки имелась замена T9I, а также замена T11A у представителей субвари-

анта ХВВ. Единственным исключением стал образец сублинии ВА.2, обнаруженный в 2023 г., у которого в данном белке была обнаружена замена Т11А, но не было замены Т9І.

В исследованных образцах был обнаружен ряд уникальных мутаций. В частности, у представителя варианта ВА.2 были обнаружены две уникальные мутации: D61N в белке гр6 и E39* в белке гр7b. У двух образцов субварианта В.1.1 в белке гр6 были обнаружены относительно редкие замены F2S. У одного образца ХВВ.2 синтез полипептидной цепи белка гр6 обрывался на 11-м аминокислотном остатке. В одном из наиболее подверженных мутациям белке гр8 для трёх образцов В.1.1 наблюдалась мутация, приводящая к удлинению цепи до 126 а. а., а также уникальная мутация у одного представителя В.1.1, приводящая к изменению аминокислотного состава и сокращению длины цепи до 55 а. а.

В нуклеокапсидном белке почти у всех представителей варианта «Омикрон» была обнаружена делеция Del RSG (32–34) и замена P13L. Это выразилось и в возникновении мутаций Del ENA (27–29) и P10S для белков orf9b соответствующих образцов. Также были обнаружены три образца с наборами уникальных мутаций: 8709 – del GG (214–215), 4061 – ins EPH (367–369), P97 – Q421*, S416R. Среди белков orf10 (38 а. а.) была обнаружена уникальная мутация N22* у представителя варианта «Дельта» незадолго до окончания циркулирования данного варианта.

Интересно отметить динамику смены генетического ландшафта SARS-CoV-2 в Приморском крае в сравнении с таковой в России с целом и сопредельными государствами. Данная динамика представляет собой обособленную картину. Так, если в августе 2022 г. в России в целом доминировал субвариант «Омикрона» ВА.5.2, то в Приморье его доля составляла лишь 50 %, а ещё 42 % относились к другим субвариантам ВА.5, что могло объясняться отложенной передачей новых генетических линий из центральных регионов страны. К концу апреля 2023 г. в крае стало наблюдаться преобладание линий ХВВ.1.5 и ХВВ.1.9 вместо более характерных для Центральной России ХВВ.1 и ХВВ.1.16. Однако такие линии также оказались доминирующими для Южной Кореи, что позволяет предположить значимость данного пути передачи вируса для формирования генетического ландшафта SARS-CoV-2 в Приморском крае, возможно, вследствие восстановления паромного сообщения с августа 2022 г.

Таким образом, изучение эволюции вируса SARS-CoV-2, остающегося в человеческой популяции и продолжающего мутировать, необходимо для своевременной оценки эпидемиологической ситуации в стране, создания диагностических тестов и новых противовирусных препаратов, а также отслеживания путей проникновения вируса в отдельные регионы.

УДК 579.61

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ГЕНЕТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ КОМПЛЕКСА ВИДОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Н. Л. Белькова¹, Е. С. Клименко¹, У. М. Немченко¹, Е. В. Григорова¹,
К. О. Ситникова¹, Р. Е. Зугеева^{1,2}, Н. Е. Смурова^{1,2}, Н. Н. Чемезова^{1,3},
Е. Д. Савилов^{1,3}

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

² ФИркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

³ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования,
г. Иркутск, Россия
nlbelkova@gmail.com

Considering that *K. pneumoniae* is one of the clinically significant species in the development of hospital purulent-septic infections, the aim of this study was the biological characterization and genotyping based on different loci of three clinical isolates of *K. pneumoniae*, isolated from different loci of patients in a children's multidisciplinary hospital regional level. A comprehensive scheme for the genomic taxonomy of clinical isolates was used, which can contribute to the unification of global and regional knowledge about the emergence and microevolution of bacterial pathogens.

Комплекс видов *Klebsiella pneumoniae* представляет собой генетически и экологически разнообразную группу бактерий, вызывающую широкий спектр инфекций у людей и животных [1]. Разработаны разные схемы генотипирования на основе мультилокусного секвенирования [2]. Очевидно, что наиболее успешной таксономической системой для генетического типирования микробных штаммов является подход мультилокусного секвенирования [3]. Ранее нами было показано, что *K. pneumoniae* в 23,1 % случаев выступает как этиологический фактор развития госпитальных гнойно-септических инфекций в детском многопрофильном стационаре регионального уровня [4]. Экспериментальные данные выявили, что клинические изоляты *K. pneumoniae* формируют биопленки с различной эффективностью, показывают разную устойчивость к дезинфицирующим средствам и антимикробным препаратам [5].

Целью настоящего исследования стала биологическая характеристика и генотипирование трех клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из разных локусов пациентов детского многопрофильного стационара регионального уровня.

Материалы и методы. В работе использован комплекс бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов. *K. pneumoniae* выделяли из клинического материала пациентов, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии детского многопрофильного стационара регионального уровня (г. Иркутск). Идентификацию изолятов проводили в соответствии с морфологическими, тинкториальными, культуральными и биохимическими свойствами с использованием АРІ-систем «bioMérieux» (Франция) и подтверждали с помощью масс-спектрометрического анализа на

приборе ultraflExtreme (Bruker Daltonics, Германия). Для оценки резистентности к антимикробным препаратам бактериальную суспензию готовили по стандартной методике с оптической плотностью 0,5 по Мак-Фарланду. Резистентность к антимикробным препаратам (АМП) определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллер–Хинтон (HiMedia), результаты анализировали в соответствии с действующими нормативными документами. Полногеномное секвенирование проводили на оборудовании Illumina NextSeq 550 с использованием наборов реагентов для приготовления библиотек Illumina® DNA Prep Tagmentation, IDT® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes Set Tagmentation и NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles) согласно рекомендациям производителя. Сборку первичных данных до контигов проводили с помощью SPAdes v. 3.11.1. Контиги были переупорядочены с использованием эталонного генома *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 (GenBank CP003200) и откорректированы с помощью MAUVE 2.4.0. Для функциональной аннотации использовали Prokka 1.14.6. Генотипирование изолятов проводили с использованием сервиса института Пастера для штаммов видового комплекса *K. pneumoniae* на основе мультилокусного типирования (MLST), MLST основного генома (cgMLST), типирования по генам *wzc* и *wzi*, а также MLST кластеров генов вирулентности (AbST, CbST, YbST, SmST, RmST) и антибиотикорезистентности (аминогликозиды, бета-лактамазы, хинолоны).

Результаты. Отмечена высокая антибиотикорезистентность изолятов *K. pneumoniae* ODKB-16 и ODKB-81 к семи и восьми антимикробным препаратам соответственно. Показано, что все три штамма были чувствительны к имипенему, меропенему (группа карбапенемы) и тигециклину (тетрациклины), но проявили устойчивость к бактериофагу клебсиелл поливалентный. Согласно результатам полногеномного анализа все штаммы имели генотип 2b. Согласно результатам мультилокусного типирования MLST по семи генам *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* и *tonB*, все штаммы показали разный генотип: *K. pneumoniae* ODKB-16 был определен как ST-65, *K. pneumoniae* ODKB-07 – ST-219, а *K. pneumoniae* ODKB-81 – ST-86. Все штаммы были отнесены к филогруппе Kp1, *K. pneumoniae* ODKB-16 и *K. pneumoniae* ODKB-81 имели K2-тип по генам *wzc* и *wzi*, но различались по профилю scgMLST629 и KL-типу. Все кластеры генов вирулентности AbST, CbST, YbST, SmST и RmST, типизирующих по локусам аэробактина, колибактина, эрсиниабактина, сальмохелина и семейства белков RmpADC были идентифицированы и охарактеризованы только в геноме изолята *K. pneumoniae* ODKB-16. Дополнительно в составе контигов был проведен поиск оперона устойчивости к теллуриду (TeO_3^{-2} , *ter*-оперона), который, как было показано ранее, тесно связан с инфекцией *K. pneumoniae*. Все локусы этого оперона также были определены только в изоляте *K. pneumoniae* ODKB-16.

Заключение. Использована комплексная схема для геномной таксономии клинических изолятов, которая может способствовать унификации глобальных и региональных знаний о возникновении и микроэволюции бактериальных патогенов.

Исследование выполнено в рамках госзадания №121022500179–0.

Список литературы

1. Wyres K. L., Lam M. M. C., Holt K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae* // Nat. Rev. Microbiol. 2020. Vol. 18, N 6. P. 344–359.
2. A Dual Barcoding Approach to Bacterial Strain Nomenclature: Genomic Taxonomy of *Klebsiella pneumoniae* Strains / M. Hennart, J. Guglielmini, S. Bridel, M. C. J. Maiden, K. A. Jolley, A. Criscuolo, S. Brisse // Mol. Biol. Evol. 2022. Vol. 39, N 7. msac135.
3. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica* / M. Achtman [et al.] // PLoS Pathog. 2012. Vol. 8, N 6. e1002776.
4. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями в детском многопрофильном стационаре / О. А. Носкова, Е. Д. Агапова, Е. А. Батурина, Г. В. Гвак // Acta biomedica scientifica. 2019. Т. 4, № 5. С. 122–126.
5. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив / У. М. Немченко, Е. А. Кунгурцева, Е. В. Григорова, Н. Л. Белькова, Ю. А. Маркова, О. А. Носкова, Н. Н. Чемезова, Е. Д. Савилов // Клиническая лабораторная диагностика. 2020. Т. 65, №10. С. 652–658.

УДК 615.033

КОНЬЮГАТЫ НАНОЛАМАЗОВ С ЦИТОСТАТИКАМИ (ДОКСОРУБИЦИН И ДИОКСАДЭТ). БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Г. М. Бердичевский, Л. В. Васина

*ПСПБГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
grishaberd@gmail.com*

The work compares the biocompatibility, cytotoxic properties and endocytosis mechanisms of Doxorubicin and Dioxadeth conjugates with nanodiamonds in vitro. The greater efficacy of Dioxadeth in the conjugate compared to the individual drug in the glioblastoma model was noted. The predominant mechanism of endocytosis for the conjugates is the actin-dependent mechanism, while for the conjugate with doxorubicin the clathrin-dependent pathway of endocytosis is also possible.

Введение. Уникальные физико-химические свойства и способность преодолевать лекарственную устойчивость делает привлекательным использование детонационных наноалмазов (ДНА) в качестве носителя в системах доставки цитостатиков. Перспективным противоопухолевым агентом представляется отечественный препарат «Диоксадэт» (Диокс), который является производным симметричного триазина и относится к группе алкилирующих соединений – этилениминов и ранее не использовался в наноформе с ДНА. В качестве эталонного препарата использовали доксорубицин (Докс) в комплексе с ДНА.

Цель исследования. Изучить и сравнить влияние на постклеточные структуры крови человека, цитотоксические свойства и механизмы эндоцитоза доксорубицина и диоксадэта в составе конъюгатов с наноалмазами детонационного синтеза in vitro.

Материалы и методы. Исследование гемолитической активности проводили с помощью метода спектрофотометрии, влияние на процесс агрегации тромбоцитов исследовали с помощью метода турбидиметрии, исследование цитотоксичности и механизмов эндоцитоза ДНА–Докс и ДНА–Диокс проводили с помощью МТТ-теста. Для определения цитотоксичности использовали клеточные линии аденокарциномы поджелудочной железы PANC-1, глиобластомы T98G и карциномы шейки матки HeLa. В качестве ингибиторов эндоцитоза применяли хлорпромазин, нистатин, СК-636, амилорид и динасор. Использовали модель клеточной линии карциномы шейки матки HeLa

Результаты и обсуждение. Отсутствие влияния конъюгатов на функциональную активность тромбоцитов и мембрану эритроцитов определяет хорошую гемосовместимость ДНА–Докс и ДНА–Диокс. Для клеточной линии PANC-1 IC50 Докс и Диокс в составе конъюгата с ДНА существенно превышают IC50 индивидуальных цитостатиков. В отношении клеточной линии HeLa IC50 цитостатиков в составе конъюгатов сопоставима с IC50 индивидуальных препаратов. Для линии T98G ДНА–Докс и ДНА–Диокс демонстрируют большую цитотоксичность при меньшей концентрации Докс и Диокс в составе

конъюгатов, при этом ДНА–Диокс превосходит ДНА–Докс. Конъюгаты интернализуются в клетки HeLa посредством актин- и клатрин-зависимых механизмов.

Таблица 1

Влияние ДНА и конъюгатов ДНА–Докс и ДНА–Диокс на спонтанный гемолиз эритроцитов

Образец	Спонтанный гемолиз, %						
	С, г/л	1 ч			3 ч		
		0,075	0,15	0,3	0,075	0,15	0,3
ДНА	0	0	0	0	0	0	
ДНА–Докс	0	0,22±0,03	2,0±0,1	0,51±0,03	0,81±0,05	2,2±0,1	
ДНА–Диокс	0	0	0	0	0	0	
Контроль +	100						
Контроль -	0,13±0,02						

Таблица 2

Характеристика цитотоксического действия ДНА, Докс, Диокс, ДНА–Докс и ДНА–Диокс в пересчете на содержание наноалмазов

Вещество	IC ₅₀		
	PANC-1	T98G	HeLa
ДНА	–	–	–
ДНА–Докс	24,0±1,2 мг/л (37±2 мкМ)	1,4±0,1 мг/л (2,2±1,1 мкМ)	2,24±0,11 мг/л (2,8±0,1 мкМ)
ДНА–Диокс	53,0±3,27 мг/л (112±6 мкМ)	0,09±0,01 мг/л (0,20±0,01 мкМ)	2,94±0,15 мг/л (6,2±0,3 мкМ)
Докс	0,30±0,02 мкМ	35,02±1,75 мкМ	2,30±0,07 мкМ
Диокс	33,3±1,7 мкМ	3,01±0,15 мкМ	4,95±0,25 мкМ

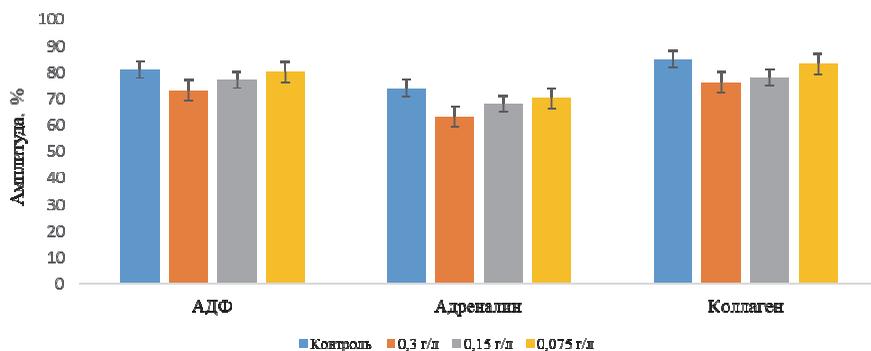


Рис. 1. Влияние ДНА–Диокс на АДФ-, адреналин-, и коллаген-индуцированную амплитуду агрегацию тромбоцитов

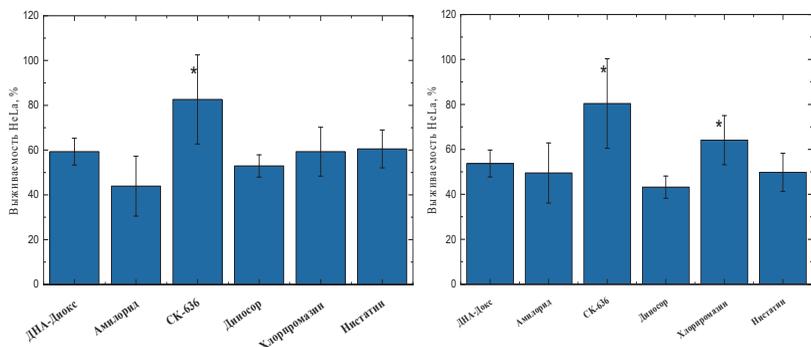


Рис. 2. Влияние ингибиторов эндоцитоза на поглощение ДНА–Докс и ДНА–Диокс клетками HeLa

Выводы. Высокий уровень гемосовместимости и большая цитотоксичность при меньшей концентрации Диокс в составе конъюгата по сравнению с индивидуальным препаратом делает перспективным дальнейшие исследования специфической противоопухолевой активности и острой токсичности ДНА–Диокс в моделях глиобластомы *in vivo*. Преимущественным механизмом эндоцитоза для ДНА–Докс и ДНА–Диокс является актин-зависимый механизм, а для ДНА–Докс возможен еще и клатрин-зависимый путь эндоцитоза.

УДК 601.4:616.931

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АЛГОРИТМ ПОИСКА И АНАЛИЗА РАЗНООБРАЗИЯ СТРУКТУР CRISPR-CAS СИСТЕМ В ГЕНОМАХ SALMONELLA ENTERICA SPP И ИНТЕРФЕРИРУЕМЫХ ИМИ ФАГОВ

А. Ю. Борисенко¹, Н. А. Арефьева^{1,2,3}, Ю. П. Джиоев¹, С. В. Эрдынеев^{1,3},
Ю. С. Букин^{4,5}, Г. А. Тетерина⁵, Д. Е. Антипин¹, О. Г. Карноухова¹,
В. П. Саловарова⁵, В. И. Злобин^{1,6}

¹Иркутский государственный медицинский университет» г. Иркутск, Россия

²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

³Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, г. Иркутск, Россия

⁴Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

⁵Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

⁶НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, г. Москва, Россия
89500720225@mail.ru

The genomes of 86 *S. enterica* spp strains from NCBI databases were examined to search for loci and structures of CRISPR-Cas systems using bioinformatics methods. It was determined that the CRISPR-Cas system belongs to CAS-Type I-E. Through spacers in CRISPR cassettes, proto-spacers were identified that corresponded to 8 phage species.

Введение. Виды рода *Salmonella* являются одними из наиболее важных патогенов во всем мире, в большей мере вызывающих пищевые отравления. В последние годы особо опасными стали сальмонеллы вида *S. enterica* spp, приобретшие множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) к современным антибиотическим препаратам [4]. Поэтому приходится повышать дозы и количество используемых фагов или разрабатывать новые антибиотики. На основании этого вновь актуальным становится вопрос о применении фаготерапии против кишечных инфекций [3]. Однако еще очень мало накопленных знаний о геномных механизмах антагонистических взаимоотношения между бактериями и фагами. В их антагонистических взаимоотношениях ведущую роль играют системы CRISPR-Cas у бактерии и anti-CRISPR-Cas у фагов [5]. Поэтому необходимы фундаментальные знания структурно-функциональных особенностей строения CRISPR-Cas систем бактерии, через которые возможно отбирать конкретные фаги, способные лизировать специфичные им бактерии [1]. Этот процесс выявления специфичных фагов определяется через структуры спейсеров в CRISPR-кассетах, которые идентичны протоспейсерным последовательностям в детектируемых ими фагах [2]. Исходя из этого, целью являлась разработка биоинформационного алгоритма поиска и анализа разнообразия структур CRISPR/Cas систем в геномах штаммов *S. enterica* spp из базы данных NCBI.

Материалы и методы. Было исследовано геномы 86 штаммов *Salmonella enterica* spp из базы данных NCBI. Использовали ряд программных методов: 1) программа MacSyFinder v.2, была использована для выявления генов Cas-белков CRISPR-Cas систем исследуемых штаммов *S. enterica* spp; 2) программа

PILER-CR применялась для получения структур повторов и спейсеров в CRISPR-кассетах; 3) программа BLASTn использовался для поиска протоспейсеров фагов в базах данных RefSeq Viral и Mycobacteriophage Database.

Результаты и обсуждение. В результате поиска генов *Cas*-белков в геномах 86 штаммах *S. enterica spp* было определено, что CRISPR- *Cas* система относится к CAS-Типу I-E. В каждом анализируемом штамме присутствовали гены *Cas*-белков: *Cas3*, *Cas8e* (*Cse1*), *Cas11* (*Cse2*), *Cas7*, *Cas5*, *Cas6*, *Cas1*, *Cas2*. Для каждого гена была получена информация о его последовательности и расположении в геномах исследуемых штаммов сальмонелл. Неоднородности строения и разнообразия CRISPR- *Cas* систем обнаружено не было. Общая схема строения CRISPR-*cas* локуса *S. enterica* представлена на рис. 1.



Рис. 1. Схема CRISPR-*Cas* локуса в геномах исследуемых штаммов *S. enterica spp*.

В базах Mycobacteriophage Database и RefSeq Viral количество найденных протоспейсеров фагов оказалось-1291. Из них 696 были идентифицированы по соответствующим 8 фаговым видам (табл. 1). Детекция протоспейсеров фагов через спейсеры CRISPR-кассет способствовала поиску соответствующих фагов, к которым бактерии *S. enterica spp* могут проявлять устойчивость. По результатам сравнения всех спейсеров в CRISPR-кассетах была выявлена частота совпадении разных протоспейсеров фагов с каждой анализируемой спейсерной последовательностью (табл. 1).

Таблица 1
Частота принадлежности разных видов фагов к конкретному спейсеру

Фаг	Количество протоспейсеров в типлируемых видах фагов	В, %
<i>Arthrobacter phage</i>	48	6,90
<i>Enterobacteria phage</i>	63	9,05
<i>Escherichia phage</i>	99	14,22
<i>Gordonia phage</i>	92	13,22
<i>Klebsiella phage</i>	98	14,08
<i>Mycobacterium phage</i>	152	21,84
<i>Salmonella phage</i>	97	13,94
<i>Streptomyces phage</i>	47	6,75
Другие не типлируемые фаги	595	85,49

Заключение. Результаты показали, что CRISPR-Cas системы исследуемых штаммов *S. enterica* spp. демонстрируют однородность их строения. Это стабильное строение CRISPR-Cas систем объясняется приспособленностью исследуемых штаммов сальмонелл к внутривидовым и межвидовым отношениям. Эти данные позволяют предположить, что анализируемые штаммы *S. enterica* spp., циркулирующие преимущественно среди популяции людей и животных объясняют причину однородности CRISPR-Cas систем и укоренению CAS-типа I-E в геномах бактерий.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00520.

Список литературы

1. Структуры CRISPR/Cas-системы в геноме штамма *Staphylococcus aureus* ST228 и фаговых рас, детектируемых методами биоинформатики / А. Ю. Борисенко [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2020. Т. 31. С. 3–18.
2. Оценка устойчивости штаммов *Staphylococcus aureus* с выявленными структурами CRISPR/Cas-систем к различным фаговым расам / Ю. П. Джиоев [и др.] // Актуальные проблемы науки Прибайкалья : сб. ст. 2020. С. 85–90.
3. Gutiérrez B, Domingo-Calap P. Phage Therapy in Gastrointestinal Diseases // Microorganisms. 2020. N 8 (9). Art. 1420. DOI: 10.3390/microorganisms8091420.
4. Diversity of antimicrobial resistance phenotypes in *Salmonella* isolated from commercial poultry farms / K. A. Liljebjelke [et al.] // Front. Vet. Sci. 2017. Vol. 4, N 96. DOI: 10.3389/fvets.2017.00096.
5. Engineered Bacteriophages Containing Anti-CRISPR Suppress Infection of Antibiotic-Resistant *P. aeruginosa* / S. Qin [et al.] // Microb Spectr. 2022. Vol. 10, N 5. e0160222. DOI: 10.1128/spectrum.01602-22.

УДК 615.273.52

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ГЕМОСТАТИКИ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

И. В. Вадяева, Е. В. Мокшин, В. В. Ревин

*Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва,
г. Саранск, Россия
irina-vadyaeva@mail.ru*

The paper presents data on the production of biocomposites based on bacterial cellulose, beet pulp pulp and chitosan with hemocoagulating properties and studied their physical and mechanical properties (density, alcohol porosity, degree of swelling and moisture binding ability) and antibacterial activity.

В настоящее время существуют недорогие традиционные повязки барьерного типа, такие как марля или хлопок, предназначенные для защиты ран от загрязнений и травм. Однако они не способствуют активному процессу заживления [3]. Кроме того, грануляционная ткань имеет тенденцию прорасти в материал, что приводит к прилипанию и травмированию пораженного участка при его удалении [2].

Важной категорией биоактивных материалов в гемостатическом применении являются природные полисахариды в нативной или модифицированной форме, обладающие превосходной биоразлагаемостью и биосовместимостью [4].

На сегодняшний день большой интерес вызывает использование целлюлозосодержащих источников в качестве гемостатических материалов, поскольку они обладают низкой стоимостью, экологически безопасны и являются возобновляемыми материалами. Получать целлюлозу можно из растительных материалов, отходов растительного происхождения и продуктов биосинтеза микроорганизмов.

Возобновляемым ресурсом для получения целлюлозы может служить свекловичный жом [1].

В качестве объектов исследования выступали: бактериальная целлюлоза (БЦ), синтезированная продуцентом *Komagataeibacter sucrofermentans* Н-110 (ВКПМ-11267); целлюлоза свекловичного жома и хитозан.

Бактериальную целлюлозу получали путем культивирования бактерии *K. sucrofermentans* в статических условиях на среде с мелассой в концентрации 50 г/л (рН 4,8–5,2) при температуре 28 °С (6 сут). Гель-пленку бактериальной целлюлозы для лизиса клеток и компонентов бактериальной среды обрабатывали 0,1 Н раствором NaOH при 80 °С (30 мин), затем обрабатывали 0,5 % HCl при 80 °С (30 мин), далее отмывали дистиллированной водой до рН 5,5–6,0. Очищенную пленку сушили при комнатной температуре и измельчали.

Свекловичный жом подвергали кислотной экстракции в 0,4 Н HCl при 90 °С (4 ч), затем щелочной экстракции в 0,5 % NaOH при 90 °С (1 ч), после чего целлюлозу промывали дистиллированной водой до рН 7,0, высушивали и измельчали.

Чтобы убедиться в чистоте БЦ и растительной целлюлозы (РЦ) использовали инфракрасную спектроскопию Фурье. Чистоту образцов определяли по отсутствию специфических пиков, нехарактерных для чистых веществ.

Для улучшения свойств БЦ и РЦ проводили ТЕМРО-окисление в присутствии 144 мг NaBr, 9 мл NaClO и 150 мкл раствора ТЕМРО реактива в 30 мл дистиллированной воды при pH 10,0 и температуре 4 °С. Реакцию останавливали добавлением большого количества воды. Степень окисления определяли методом сорбции метиленового синего.

Биокомпозиты получали путем смешивания неокисленной и окисленной бактериальной и растительной целлюлоз и хитозана в различных соотношениях, замораживания и лиофильного высушивания.

У полученных биокомпозитов определяли плотность, пористость по спирту, влагосвязывающую способность и степень набухания.

В ходе работы было установлено, что наибольшей плотностью 0,20 г/см³ обладал биокомпозит окисленная растительная целлюлоза/хитозан (ОРЦ/Х) (1:1) (рис. 1, А). Наибольшей пористостью по спирту (81,91±0,9) % обладал биокомпозит окисленная бактериальная целлюлоза/окисленная растительная целлюлоза/хитозан (ОБЦ/ОРЦ/Х) (1:2:1) (рис. 1, Б). Наибольшей степенью набухания (889,17±24,55) % обладал биокомпозит сырая растительная целлюлоза/хитозан (СРЦ/Х) (16:1) (рис. 1, В).

Было установлено, что влагосвязывающая способность (ВСС) биокомпозитов достигает максимума к 1 ч. Наибольшая величина ВСС – (944,15±85,39) % наблюдалась в варианте окисленная растительная целлюлоза/хитозан (ОРЦ/Х) (2:1) (рис. 1, Г).



Рис. 1. Биокомпозиты
А – ОРЦ/Х 1:1; Б – ОБЦ/ОРЦ/Х 1:2:1; В – СРЦ/Х 16:1; Г – ОРЦ/Х 2:1

Стоит отметить, что при включении в состав биокомпозитов окисленных бактериальной и растительной целлюлоз, шло увеличение плотности, пористости по спирту, степени набухания и ВСС. Это окажет положительное влияние на гемокоагуляцию крови этими биокомпозитами за счет быстрого набухания и связывания большого количества жидкой составляющей крови, что приведет к меньшим ее потерям.

Кроме того, у полученных биокомпозитов определяли антибактериальную активность. Наибольшей она была в вариантах: бактериальная целлюлоза/растительная целлюлоза/хитозан (БЦ/РЦ/Х) (1:1:1), растительная целлюлоза/хитозан (РЦ/Х) (1:1), СРЦ/Х (1:1), ОБЦ/ОРЦ/Х (1:1:1) и ОБЦ/ОРЦ/Х (1:4:1).

Зона ингибирования роста микроорганизма *Staphylococcus aureus* 209 P вокруг фрагмента биокомпозита составила 1 мм. Также можно констатировать общую закономерность: чем ниже содержание хитозана в биокомпозите, тем ниже его антибактериальные свойства и тем меньше зона ингибирования.

Таким образом, в ходе нашей работы были получены биокомпозиты, которые можно использовать как новые гемокоагулирующие материалы для остановки массивных кровотечений. Из полученных образцов наилучшим по таким показателям, как пористость и степень набухания, оказался вариант ОБЦ/ОРЦ/Х в соотношении 1:2:1 ((81,91±0,9) % и (748,63±24,01) %, соответственно). Максимальная антибактериальная активность также наблюдалась у этого варианта.

Список литературы

- 1 Патент № 2580884 С1 Российская Федерация, МПК С08В 37/00 (2006.01). Способ получения пектина и целлюлозы из свекловичного жома : № 2014154069/13 : заявл. 29.12.2014 : опубл. 10.04.2016 / Ревин В. В., Пестов Н. А. 6 с.
- 2 Bacterial Cellulose : Functional Modification and Wound Healing Applications / W. He, J. Wu, J. Xu, D. A. Mosselhy, Y. Zheng, S. Yang // Advances in Wound Care (New Rochelle). 2021. Vol. 10, N 11. P. 623–640. DOI: 10.1089/wound.2020.1219
- 3 Characterization of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing in Different Order Impregnation of Chitosan and Collagen / K. M. Pasaribu, S. Gea, S. Ilyas, T. Tamrin, I. Radecka. // Biomolecules. 2020. Vol. 10, № 11. P. 1511. DOI: 10.3390/biom10111511
- 4 Sung Y. K., Lee D. R., Chung D. J. Advances in the development of hemostatic biomaterials for medical application // Biomaterials Research. 2021. Vol. 25, N 1. P. 37. DOI: 10.1186/s40824-021-00239-1

УДК 579.68

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОРГАНИЗМА *PARASALMO MYKISS* WALBAUM (SALMONIDAE)

М. А. Германова, А. Д. Риккинен, Н. А. Сидорова

Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск, Россия
marinagermanoval2@yandex.ru

With increasing intensification of trout production in Karelia, the epizootic situation is worsening. To solve this problem, it is proposed to use methods of rapid diagnostics based on the isolation of Enterobacteriaceae strains, as well as serological studies.

В настоящее время к наиболее распространённым заболеваниям объектов высокопродуктивного рыбоводства продолжают относиться бактериозы, вызванные группой условно-патогенных энтеробактерий (УПЭ). В связи с широким распространением УПЭ в окружающей среде, связанным с полигостальностью и убиквитарностью большинства видов, возрастает роль УПЭ в эпизоотических процессах, что часто опосредовано биологическими свойствами атипичных штаммов аборигенного происхождения. Ситуация усугубляется увеличением оборотов разведения ценных видов рыб, использованием антибиотических препаратов и некачественных комбикормов с высокой степенью микробной контаминации, в совокупности приводящих к возникновению состояния стресса и иммунодефицита у объектов аквакультуры.

Цель выполненного исследования заключалась в описании структуры и биологических свойств представителей бактериального сообщества кишечной микрофлоры радужной форели с учётом серологических и гематологических показателей.

Для реализации поставленной цели изучена микрофлора кишечника 30 особей радужной форели *Parasalmo mykiss* в возрасте 1+ и 2+, культивируемых в садковых хозяйствах Республики Карелия. Для анализа проб микрофлоры кишечника отбирали внешне здоровую рыбу, у которой оценивали морфофизиологические показатели и проводили ихтиопатологический осмотр по принятым в рыбоводстве методикам [3]. Выделение и идентификацию условно-патогенных энтеробактерий (УПЭ) проводили с учетом общепринятых в микробиологии подходов к исследованию качественного и количественного биоразнообразия микроорганизмов желудочно-кишечного тракта [5]. Для идентификации УПЭ применяли фенотипические признаки, регламентируемые в Определителе бактерий Берджи (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2007), и профиль рибосомальных белков энтеробактерий, полученный с помощью технологии MALDI-TOF. Анализ данных спектрометрии выполняли с использованием запатентованного алгоритма bioMérieux, генерирующего идентификацию грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжеподобных и плесневых грибов, *Mycobacterium* и *Nocardia*. Параллельно проводи-

ли серотипирование УПЭ в развернутой реакции агглютинации Райта, где в качестве антител использовали сыворотку крови исследуемых особей форели, а в качестве корпускулярных антигенов – культуры энтеробактерий со специфическими O-, H- и K- антигенными детерминантами и определяли ихтиогематологические показатели (СОЭ, долю эритроцитов и лейкоцитов в единице объема крови, морфологические особенности эритроцитов) [2; 1]. Данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики с помощью программы MS Excel.

По результатам посмертного вскрытия рыбы, выполненного для выявления патологий в морфологии органов и тканей, обнаружены эрозии в области рта (36 %), некротические проявления в области головы и тела (63 %), изменения цвета и структуры печени (48 %), геморагии на внутренних органах (11 %), воспаление ануса (13 %). Благодаря выполненному микробиологическому анализу, в составе микрофлоры кишечника обнаружены представители 27 родов, принадлежащие к 18 семействам и 6 типам. Преобладали представители четырёх семейств Bacillaceae (24,6±0,4 %), Eubacteriaceae (11,6±0,3 %), Enterobacteriaceae (14,7±0,3 %) и Pseudomonadaceae (11,1±0,2 %). УПЭ были представлены видами рода *Alcaligenes* spp., *Cytophaga* spp., *Escherichia* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp, со свойствами протеолитической, липолитической и гемолитической активностью. В результате выполненного гематологического анализа установлено, что на момент исследования показатели СОЭ исследуемых особей находились в пределах физиологической нормы для радужной форели и изменялись от 2 до 9 мм/ч. Однако средние и максимальные значения СОЭ в возрастной группе 2+ превышали соответствующие значения в группе 1+ в 1,5 раза, что позволяет судить о тенденции к увеличению исследуемого параметра крови с возрастом в присутствии ряда воспалительных патологических процессов, описанных ранее. В среднем у форели на долю эритроцитов приходилось 82±4,7 % клеток крови, а на долю лимфоцитов – 11,2±1,9 %. Во всех вариантах развёрнутой реакции агглютинации был обнаружен отчетливо выраженный агглютинат, а диагностический титр, при котором наблюдалась положительная реакция, соответствовал разведению исследуемой сыворотки 1:640.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном вирулентном потенциале УПЭ, выделенных из бактериального сообщества кишечной микрофлоры исследуемых особей *P. mykiss* и циркулирующих в рыбохозяйственных водоемах Карелии. Можно предположить, что сниженная врожденная резистентность организма радужной форели на фоне стресс-факторов абиотического и биотического генеза, способствует возникновению и развитию аборигенных штаммов – возбудителей бактериозов, которые часто не вызывают выраженных эпизоотий, но могут длительно персистировать в организме хозяина и приводить к хронизации инфекционного процесса, который часто сопровождается соматическими осложнениями. Это негативно влияет на процесс рыборазведения и приводит к снижению качества рыбной продукции. Полученные первичные данные по специфическому иммунному отклику организма радужной форели

на присутствие УПЭ, представляют исходный материал для создания наукоёмкой базы данных с целью обоснования внедрения методов комплексной экспресс-диагностики в практику ихтиологического надзора для раннего выявления атипичных бактериальных патогенов, циркулирующих на акватории рыбохозяйственных водоемов. Кроме того, согласно опубликованным данным по результатам комплексного исследования реакций врождённого и приобретённого иммунитета, у рыб в естественных и экспериментальных условиях [4], параметры иммунитета рыб могут использоваться, как объективные показатели биологического загрязнения водоёмов.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026), проводимого совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

Список литературы

1. Житенева Л. Д., Полтавцева Т. Г., Рудницкая О. А. Атлас нормальных и патологически измененных клеток крови рыб. Ростов н/Д : Ростов. кн. изд-во, 1989. 109 с.
2. Иванова И. Т. Атлас клеток крови рыб (сравнительная морфология и классификация форменных элементов крови рыб). М. : Легкая и пищ. пром-сть, 1982. 184 с.
3. Ихтиопатология : учеб. для студентов вузов, обучающихся по специальности 311700 «Вод. биоресурсы и аквакультура» / Н. А. Головина [и др.]. М. : Мир, 2003. 448 с.
- Киташова, А. А. Реакции врождённого и приобретённого иммунитета у рыб в естественных и экспериментальных условиях : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.10, 14.00.36. М., 2002. 185 с.
4. Качественный состав бактериофлоры кишечника пресноводных рыб. изучение некоторых культуральных и физиолого-биохимических свойств. URL: <https://scienceforum.ru/2014/article/2014002525>

УДК 616-097.1+615.277.3:616-006.44

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕОАНТИГЕНОВ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНЫХ ПРОТИВОЛЕЙКОЗНЫХ ВАКЦИН

**В. В. Гринев, И. Н. Ильюшенко, Е. В. Гузова,
И. С. Трусов, В. А. Сучек**

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
grinev_vv@bsu.by*

A comprehensive approach was developed to identify new proteins expressed in human leukemia cells. The approach is based on the study of differential RNA splicing. Some of the new proteins may be neoantigens of leukemia cells.

В настоящее время вакцинирование рассматривается как один из методов повышения эффективности эрадикации лейкозного клона из организма пациента. Метод основан на способности дендритных клеток процессировать лейкозные антигены и презентировать их в комплексе с молекулами HLA Т-лимфоцитам, что приводит к усилению противоопухолевого иммунитета. В качестве таких антигенов могут выступать как опухоль-ассоциированные, так и опухоль-специфические антигены. Предпочтительным является второй класс антигенов, обычно называемых неоантигенами, которые возникают как результат мутирования нормальных генов. Однако разнообразие таких антигенов, равно как и их иммуногенность, ограничены, что является одним из факторов, сдерживающих широкое и успешное применение не только противолейкозных вакцин, но и противолейкозной CAR-T либо TCR-CAR-T терапии.

В то же время хорошо известно, что существенным источником разнообразия протеома клеток человека является альтернативный сплайсинг [2]. Более того, известно, что протекание сплайсинга в лейкозных клетках нарушено, а также изменена функциональная активность систем контроля качества получаемых молекул РНК [1; 3]. Потенциально это может приводить к появлению новых аминокислотных последовательностей, в том числе неоантигенов с высокой иммуногенностью. В связи с этим мы задались целью разработать комплексный подход для идентификации потенциально иммуногенных пептидов, появляющихся в лейкозных клетках в силу изменений в работе системы сплайсинга РНК.

Разработанный нами подход является комбинацией интеллектуального анализа транскриптомных и протеомных данных и выборочной экспериментальной валидации наиболее значимых результатов такого анализа с помощью стандартных молекулярно-биологических методов (рис. 1).

Мы использовали как оригинальные транскриптомные данные, так и общедоступные данные из баз GEO/SRA/ENA, TCGA, TARGET и GTEx, полученные на образцах лейкозных клеток с разным цитогенетическим и молекулярно-генетическим статусом, а также нормальных клеток крови (CD34-положительные гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки из красного

костного мозга и пуповинной крови и фракция мононуклеарных клеток периферической крови). Эти данные использовались либо для частичной, либо для полной реконструкции транскриптомов целевых клеток. В первом случае идентифицировались дифференциальные сплайсинговые события разных мод (в том числе сохранение интронов) и делалась реконструкция нуклеотидных последовательностей, фланкирующих выявленные экзон-экзонные стыки, после чего проводилась их трансляция *in silico* в трех рамках считывания. Во втором случае, после реконструкции полноразмерных РНК, в них идентифицировались как основные (mORFs), так и предшествующие основным (uORFs из 5'UTRs) открытые рамки считывания, которые затем транслировались *in silico*.



Рис. 1. Основные этапы идентификации иммуногенных пептидов лейкозных клеток человека

Набор аминокислотных последовательностей, полученный в результате всех трансляций *in silico*, использовался затем для поиска в масс-спектрометрических данных пептидов, подтверждающих их экспрессию. Поиск проводился с помощью нейронной сети DIA-NN, а результатом стали наборы белков с подтвержденной экспрессией в целевых клетках. Часть из таких белков оказалась новыми, ранее не известными белковыми продуктами генов человека. Интересно, что существенная доля новых белков (в среднем около 50–70 %, в зависимости от нозологии) кодируется псевдогенами, а не является продуктами, как ожидалось, дифференциального сплайсинга.

Для выяснения, могут ли новые белки быть источником потенциально иммуногенных пептидов, мы разработали отдельный биоинформатический пайплайн (конвейер), куда включили оценку (имму)протеасомной деградации белков, аффинности связывания высвобождаемых пептидов с TAP и моле-

кулами HLA, стабильности комплекса пептид/HLA, его распознаваемости T-клеточным рецептором, иммуногенности и чужеродности пептидов. Поскольку точность некоторых этапов нашего пайплайна не является высокой (например, точность предсказания будет ли комплекс пептид/HLA распознаваться T-клеточным рецептором не превышает 80 %), то для получения окончательного списка иммуногенных пептидов нам нужна экспериментальная валидация, которая активно проводится в настоящее время. Однако уже имеющихся результатов достаточно, что бы приступить к пилотной работе по получению дендритных клеток, напрямую праймированных пептидами, специфическими для лейкозных клеток, либо же экспрессирующих эктопически мультивалентный антиген на основе найденных пептидов.

Список литературы

1. A genome-wide aberrant RNA splicing in patients with acute myeloid leukemia identifies novel potential disease markers and therapeutic targets / S. Adamia [et al.] // *Clin. Cancer Res.* 2014. Vol. 20. P. 1135–1145.
2. Baralle F. E., Giudice J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18. P. 437–451.
3. RUNX1/RUNX1T1 mediates alternative splicing and reorganizes the transcriptional landscape in leukemia / V. V. Grinev [et al.] // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12(1). P. 1–16.

УДК 601.4:616.931

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ БОРЬБЫ С ИНФЕКЦИЯМИ, ВЫЗЫВАЕМЫХ *SALMONELLA ENTERICA SPP* И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ТАРГЕТНОЙ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ «ОМИКС» И CRISPR/CAS ТЕХНОЛОГИИ

Ю. П. Джиоев¹, Н. А. Арефьева^{1,2,3,4}, А. Ю. Борисенко¹, С. В. Эрдынеев^{1,3},
Л. А. Мирошниченко⁵, Ю. С. Букин^{4,6}, О. Г. Карноухова¹, Г. А. Тетерина⁴,
В. П. Саловарова⁴, С. И. Малов¹, В. И. Злобин^{1,7}

¹Иркутский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Иркутск, Россия

²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск, Россия

³Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока, г. Иркутск, Россия

⁴Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

⁵Институт математики им. С. Л. Соболева СО РАН, г. Новосибирск, Россия

⁶Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

⁷Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им.
Н. Ф. Гамалеи, г. Москва, Россия
alanir07@mail.ru

Salmonella enterica spp is represented by more than 2600 serotypes, which in most cases cause salmonellosis and are distributed throughout the world. They cause about 2.8 billion cases of diarrheal disease each year, with more than 300,000 deaths. *S. enterica spp* have become multi-drug resistant and have been included by the WHO as a high priority bacterial pathogen. Today, phage therapy technologies are being reintroduced to replace antibiotic therapy. But the implementation of phage therapy is limited due to little knowledge about the genomic mechanisms of antagonism between bacteria and phages through their CRISPR-Cas and anti-CRISPR-Cas systems, respectively. To obtain new knowledge about their antagonism, omics methods and CRISPR/Cas technologies are needed. The goal is a review of the biomedical problems of combating infections caused by *S. enterica spp* and the prospects for the development of targeted phage therapy.

Сальмонеллы представляют собой факультативно-анаэробные грамотрицательные палочковидные, неспорообразующие бактерии рода *Salmonella* из семейства *Enterobacteriaceae*. Род *Salmonella* включает 3 вида: *S. bongori*, *S. enterica* и *S. subterranea*. Из них только *Salmonella enterica* представлена 6 подвидами: *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. houtenae*, *S. enterica subsp. indica*, *S. enterica subsp. salamae* [4]. Также этот род подразделяется на брюшнотифозные серотипы (*S. enterica var Typhi* и *S. enterica var Paratyphi A*) и на небрюшнотифозные серотипы *S. enterica spp*. [2]. Среди видов сальмонелл серотипы *S. enterica spp* (более 2600) в большинстве случаев вызывают сальмонеллез. По глобальной статистике они ежегодно вызывает около 2,8 млрд случаев диарейных заболеваний, а смертность достигает более 300 тыс. чел. В большинстве случаев сальмонеллез передается через зараженные продукты, такие как молочные и мясные продукты, яйца птиц. Они также является одним из наиболее распространенных патогенов в мире, вызывающих пищевые отравления (рис. 1) [1; 3]. Проблема сальмонеллёзов осложняется еще и прогрессирующим распространением бак-

терий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) среди клинических и сельскохозяйственных штаммов *S. enterica* spp. Подобные штаммы *S. enterica* spp в 2017 г. ВОЗ включил в список из 12 бактериальных патогенов с МЛУ. Они были, сгруппированы по уровню их приоритетов в: критические, высокие и средние. Вид *S. enterica* spp попадал в группу с высоким приоритетом [<https://www.who.int/ru/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>]. Поэтому во многих случаях антибиотикотерапия уже становится не эффективной. В связи с этим вновь начали активно внедрять технологии фаготерапии против подобных инфекций. Появляются работы, в которых проводятся исследования по скринингу фаговых видов с таргетными характеристиками против конкретных патогенов. Однако пока внедрение фаготерапии в практику имеет ограничения в связи с недостаточной информацией о геномных механизмах антагонистических взаимоотношениях между бактериями и фагами. В этих взаимоотношениях ведущую роль играют системы CRISPR-Cas у бактерии и anti-CRISPR-Cas у фагов. Для получения более фундаментальных знаний об их антагонизме необходимы как методы «омикс»: геномики, протеомики, транскриптомики, так и биоинформатики в связке со структурно-функциональными особенностями самих CRISPR-Cas у бактерии и anti-CRISPR-Cas у фагов. Исходя из этого, целью исследования является проведение поиска и анализа локусов и структур CRISPR-Cas систем в геномах штаммов *S. enterica* spp и интерферируемых ими протоспейсеров фагов, представленных в базах данных NCBI.

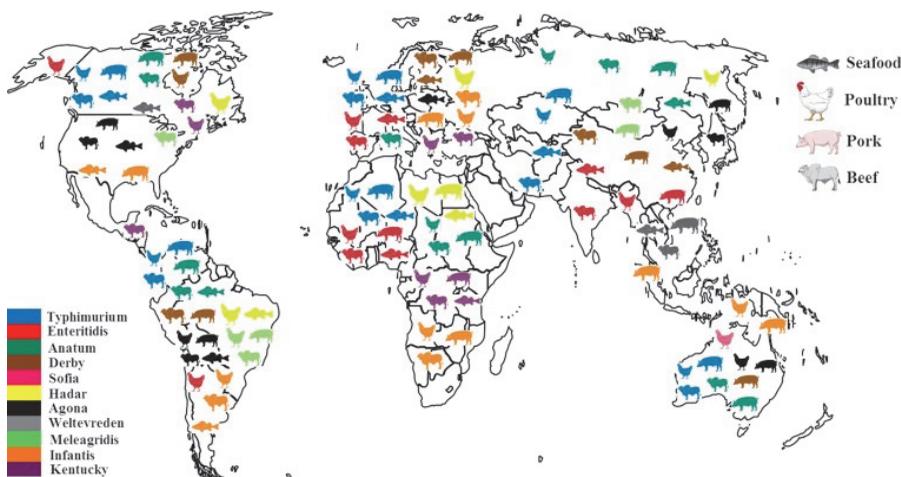


Рис. 1. Мировое распространение серотипов *Salmonella enterica* spp и их экологические источники

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда, № 23-25-00520.

Список литературы

1. Andino A, Hanning I. *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars // Scientific World Journal. 2015. Art. 520179. DOI: 10.1155/2015/520179.
2. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa / Feasey N. A. [et al.] // Lancet. 2012. N 379 (9835). P. 2489–2499. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61752-2.
3. Knodler L. A., Elfenbein J. R. *Salmonella enterica* // Trends Microbiol. 2019. Vol. 27, N 11. P. 964–965. DOI: 10.1016/j.tim.2019.05.002.
4. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ / A. C. Parte [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2020. Vol. 70. P. 5607–5612. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332.

УДК 616-006.484.04+578.242.46

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-LACT В ОТНОШЕНИИ 3D-КУЛЬТУР КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА U-87 MG

М. А. Дымова¹, Т. А. Шнайдер², С. А. Четкина², Г. О. Петров¹,
Д. О. Малышева¹, Д. В. Дроков¹, А. Б. Агеенко¹, Н. С. Васильева¹,
В. А. Рихтер¹, Е. В. Кулигина¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск, Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия
maya. a. rot@gmail.com

In this work, an assessment was made of the cytotoxic effect of the oncolytic virus VV-GMCSF-Lact against 3D human glioblastoma U-87 MG cells. Using various methods (cytometry, microscopy, and measurement of viral titer), the oncotoxic effect of the virus on cells of 3 cultures was shown.

Одним из перспективных методов лечения опухолей является виротерапия, в основе которой лежит прямой лизис вирусом опухолевых клеток и вирусопосредованный противоопухолевый иммунный ответ организма. Для рекомбинантного штамма вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact, продуцирующего GMCSF человека и онкотоксический белок лактаптин, показано цитотоксическое и противоопухолевое действие в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, соответственно, при использовании адгезивных культур клеток U-87 MG глиобластомы человека. 3D-культуры являются более релевантной моделью опухоли в сравнении с адгезивными моделями, так как более полно отражают реалистичный сценарий развития опухолевого процесса, а также ответа опухоли на противоопухолевую терапию. Целью данной работы являлась оценка цитотоксического действия онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении клеток 3D-культур глиобластомы человека U-87 MG.

В работе использовались следующие методы: культивирование 3D культур клеток, цитофлуориметрия, микроскопический анализ, титрование вируса, статистическая обработка данных.

Клетки U87 MG были трансдуцированы лентивирусным вирусом, несущим ген GFP. Цитотоксичность вируса VV-GMCSF-Lact (IC₅₀) в отношении исследуемых клеток составила 0,024 БОЕ/клетку. Далее клетки U87 MG культивировали в условиях формирования 3D структур. С помощью микроскопического анализа показано онколитическое действие вируса на клетки 3D культур уже спустя 24 ч после начала инкубации. Методом проточной цитофлуориметрии показано увеличение гранулярности клеток глиобластомы под действием вируса, что указывает на активную репликацию вируса в клетках. Титр вируса составил 0,44 БОЕ/клетку.

В дальнейшем для тестирования онколитического действия VV-GMCSF-Lact планируется использовать не только 3D-культуры глиобластомы человека, но и церебральные органоиды, полученные в процессе сокультивирования клеток глиобластомы и индуцированных плюрипотентных клеток человека.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-64-00041, https://rscf.ru/prjcard_int?22-64-00041.

УДК 577.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ПРЯМОЙ ИОНИЗАЦИЕЙ

**Д. С. Заворотнюк, А. А. Сорокин, Д. С. Бормотов, В. А. Елиферов,
С. И. Пеков¹, К. В. Бочаров, И. А. Попов**

Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

denis.zavorotnyuk@gmail.com

Ambient ionization mass-spectrometry (AIMS) is an outstanding method for the rapid biological samples molecular profiling. MS data processing is a challenging task and should be performed with settings depending on the nature of samples, ion acquisition modes and the further analysis. Here the methods for optimal preprocessing parameters determination are presented. The results are obtained for the direct ionization MS-data acquired from human brain tissues of patients with diagnosis Glioblastoma and Non-tumor pathology.

Радикальное удаление опухоли до сих пор остается наиболее эффективным лечением онкологических заболеваний головного мозга. Однако при этом возникает задача определения границ опухоли для предотвращения, с одной стороны, рецидива и избыточной резекции и нейропатологических последствий с другой. Основными методами определения границ опухоли до сих пор остаются ПЭТ/МРТ и гистохимический анализ. Однако эти методы являются трудозатратными и требуют значительного количества времени.

Масс-спектрометрия (МС) с прямой ионизацией позволяет за короткое время получить данные о молекулярном строении образца. Однако на текущий момент подавляющее большинство инструментов для работы с масс-спектрометрическими данными реализовано для спектров, полученных с помощью МС в тандеме с газовой или жидкостной хроматографией. Эти данные отличаются тем, что количество пиков в спектрах намного меньше, чем в спектрах, полученных МС с прямой ионизацией. Поэтому за простоту в подготовке образца и скорость анализа приходится платить более сложными и богатыми по составу масс-спектрами. При этом такое исследование порождает большое количество данных, для анализа которых необходимо применять автоматизированные методы обработки и сложные алгоритмы анализа, поэтому большое внимание должно быть уделено качеству этих данных и их предварительной обработке.

Предварительная обработка МС-данных включает в себя такие действия, как нормализация значений интенсивностей, определение и удаление шума, определение и выравнивание положения пиков. В зависимости от природы образцов, использованных в исследовании, МС-прибора, режима сбора ионов и типа дальнейшего анализа перечисленные выше действия должны выполняться с различными настройками.

В работе на основании МС-профилей, полученных с образцов тканей головного мозга человека с диагнозами Глиобластома и патологии не-опухолевой природы с использованием масс-спектрометра Thermo LTQ XL Orbitrap ETD с картриджной ионизацией, реализованы два метода определения оптимальных параметров предварительной обработки:

- по минимальному значению критерия Акаике модели логистической регрессии
- с помощью интерактивного Shiny-приложения для проведения экспертной оценки качества обработки спектров.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-03-2022-107, проект № 0714-2020-0006). Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ХФ им. Н. Н. Семенова РАН.

УДК 575.112+577.212.3

КОМПЛЕКСНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПАЙПЛАЙН ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ И АННОТАЦИИ САЙТОВ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНОМЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ОСНОВАННЫЙ НА ЯЗЫКЕ ПРОГРАММИРОВАНИЯ R И BIOCONDUCTOR

**И. Н. Ильюшёнко, Н. Н. Яцков, Е. В. Смолякова, И. С. Трусов,
Я. В. Шинкевич, В. В. Скажун, В. В. Гринев**

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
nov. ilyushonok@gmail.com*

We propose an approach for developing a flexible and effective pipeline for SNV discovery in NGS data, based on R language. Precision and recall of this pipeline can be assessed by reference SNV set, created by Genome In A Bottle project (GIAB).

Эффективное обнаружение однонуклеотидных вариаций (single nucleotide variation, SNV) генома человека критически важно для решения задач медицины (в том числе персонализированной), криминалистики, антропологии. Сложности в детекции SNV связаны в первую очередь не с наличием возможности проводить высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing, NGS), а с хранением, анализом и интерпретацией его данных. Для решения рутинных задач по идентификации SNV можно использовать проприетарные решения с закрытым исходным кодом, которые предоставляются производителями платформ для секвенирования. Перспективным, при этом, представляется разработка более гибкого, модульного пайплайна, сопоставимого с проприетарными аналогами по эффективности и удобству использования, но более доступного для конечного пользователя. По нашему мнению, хорошей основой для разработки такого пайплайна может служить язык программирования R – мощный инструмент анализа и визуализации биологических данных.

Интересующий нас пайплайн должен эффективно реализовывать все этапы обнаружения SNV: 1) автоматический либо полуавтоматический анализ качества исходных ридов с последующей их обработкой при необходимости; 2) картирование ридов на референс-геном; 3) идентификацию и аннотацию SNV. Указанные этапы можно производить с использованием средств как самого R, так и других языков программирования, вызываемых из его среды.

На сегодняшний день наиболее распространённым инструментом для оценки качества сырых ридов является FastQC [2]. Для обрезки служебных последовательностей и удаления нуклеотидов с низким качеством по концам ридов используются программы Cutadapt [5] и Trimmomatic [3]. Их полноценной R-альтернативой является библиотека FastqCleaner (депонирована в Bioconductor). Она позволяет рассчитать метрики качества библиотек ридов и обработать их в соответствии с заданием: удалить нуклеотиды низкого качества, произвести обрезку концов на указанное число нуклеотидов, удалить адаптеры, исклю-

чить короткие риды, дубликаты и т. д. FastqCleaner имеет графический интерфейс, реализованный через библиотеку shiny [4], хотя можно проводить обработку ридов, вызывая отдельные высокоуровневые функции непосредственно из кода. Схожим с FastQC функционалом обладает библиотека qcikitfastq (депонирована в Bioconductor). Для анализа множества библиотек ридов предполагается интеграция в пайплайн R-пакетов ngsReports (Bioconductor) и fastqc (CRAN) для составления комбинированного отчёта.

Выравнивание подготовленных ридов на референс-геном может проводиться напрямую из R с помощью библиотеки Rsubread (Bioconductor), способной работать как с данными геномного (алгоритм Subread) так и транскриптомного (Subjunc) секвенирования. Алгоритм картирования здесь реализован в парадигме *seed-and-vote*, позволяющей осуществлять картирование с высокой точностью и скоростью. Манипулировать полученными BAM-файлами (проводить отбор ридов, их сортировку, индексирование BAM-файлов и др.) предполагается с помощью библиотеки Rsamtools (Bioconductor).

Индустриальным стандартом для детекции SNV на сегодняшний день является Genomic Annotation Toolkit (GATK) [6]. В его состав входят модули, предназначенные для детекции (HaplotypeCaller, Mutect2) и аннотации SNV, а также ряд утилит для предобработки данных, ранее являвшихся частью Picard Tools. Полноценной замены для них в R на сегодняшний день не существует, поэтому мы воспользовались R-функциями `system()` и `system2()`, позволяющими использовать системные команды, доступные из командной строки Unix. С их помощью были написаны пользовательские функции-оболочки для необходимых компонентов GATK. Также нами прорабатывается возможность использования альтернативных алгоритмов обнаружения SNV, часть из них уже реализована в виде R-библиотек [1].

Задачи как по имплементации нового алгоритма детекции SNV, так и по оптимизации параметров работы уже существующего, не являются тривиальными. Тем не менее, наличие эталонного набора данных, включающего исходные риды и перечень определённых с высокой точностью SNV, значительно облегчает их решение. Для человеческого генома в качестве такого эталона мы используем данные, полученные проектом Genome In A Bottle (GIAB) [7]. Они включают геномы семи человек (среди которых два трио «отец, мать, ребёнок»), секвенированные при помощи различных платформ на различную глубину. Для каждого из участников проекта доступны все исходные данные (файлы FASTQ, BAM, VCF для каждого из секвенирований), а также интегрированные VCF, включающие лишь SNV, присутствие которых в ДНК подтверждено секвенированием на нескольких платформах. Указанные данные могут быть свободно загружены с серверов GIAB и использованы, в том числе в коммерческих разработках. Этот же набор данных можно использовать и для отладки процесса секвенирования образцов в собственной лаборатории, поскольку биоматериал участников проекта депонирован в различные банки биоматериала в виде образцов ДНК и иммортализованных клеточных культур.

Таким образом, возможности среды программирования R позволяют создать гибкий и эффективный пайплайн для детекции и аннотации SNV в данных высокопроизводительного секвенирования. При оснащении дружелюбным к пользователю интерфейсом и пресетами настроек, основанными на эталонных данных, он может быть использован в любых учреждениях для рутинного анализа данных NGS.

Список литературы

1. Сравнительный анализ алгоритмов обнаружения сайтов однонуклеотидных вариаций / Я. В. Шинкевич [и др.] // Информационные системы и технологии : материалы Междунар. науч. конгр. по информатике. В 3 ч. Ч. 2. Респ. Беларусь, Минск, 27–28 окт. 2022 г. / редкол. : С. В. Абламейко (гл. ред.) [и др.]. Минск : БГУ, 2022. С. 61–66.

2. Andrews S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data // Babraham Bioinformatics. 2010. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (date of access: 12.09.2023).

3. Bolger A., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. Vol. 30, N 15. P. 2114–2120.

4. Easy Web Application Framework for R / W. Chang [et al.]. URL: <https://shiny.posit.co/> (date of access: 01.09.2023).

5. Martin M. Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads // EMBnet journal. 2011. Vol. 17, N 15.

6. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data / A. McKenna [et al.] // Genome Res. 2010. Vol. 20. P. 1297–1303.

7. Genome In a Bottle // National Institute of Standards and Technology. URL: <https://www.nist.gov/programs-projects/genome-bottle> (date of access: 12.09.2023).

УДК 616.98:578

ОСОБЕННОСТИ ИНФИЦИРОВАННОСТИ *BORRELIA* SPP. ПОДВИДОВ *IXODES PAVLOVSKYI* В ЗОНАХ СИМПАТРИИ С *IXODES PERSULCATUS*

В. Ю. Колесникова¹, В. А. Рап², А. В. Ляпунов¹, Т. И. Епихина²,
А. Ю. Тикун², А. Б. Тимошкин³, Е. А. Сидорова¹, А. Я. Никитин¹,
Е. И. Андаев¹

¹Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Иркутск, Россия

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск, Россия

³Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае Роспотребнадзора,
г. Красноярск, Россия
valyusha.kolesnikova.92@mail.ru

Representatives of the Ixodidae family are of great epidemiological significance, as they are carriers of a large number of pathogens of natural focal human infectious diseases. According to the unified sanitary requirements (SanPiN 3.3686-21), three species of the genus *Ixodes* play a special role in the transmission of tick-borne encephalitis and *Borrelia* bacteria in Russia, including *I. pavlovskyi*, in a number of areas in the Asian part of the country. The epidemiological significance of this species in areas of sympatry with *I. persulcatus* will be determined by its abundance, spectrum, and the level of infection with dangerous pathogens.

В настоящее время считается, что эпидемиологическое значение у *Ixodes persulcatus* (таежный клещ) больше, чем у *I. pavlovskyi*. Характерной чертой экологии *I. pavlovskyi* является встречаемость в одних локациях с таежным клещом, совпадающие сроки активности и частично круг прокормителей на разных фазах жизненного цикла [4; 6]. Естественно и характер инфицированности возбудителями природно-очаговых инфекций у двух родственных видов сходен, однако (что важно подчеркнуть) не идентичен [3; 10]. В конце XX – начале XXI в. выяснилось, что ареал *I. pavlovskyi* расширяется и вопреки «классическим» представлениям систематиков, установлено, что между этим видом и таежным клещом возможна гибридизация, которую начиная с 2015 г. методом ПЦР в зонах симпатрии регулярно выявляют непосредственно в природе [8; 9; 11]. Установленный факт, наряду с данными о расширении ареала *I. pavlovskyi* [1; 4; 7], резко увеличил актуальность изучения биологии и медицинского значения этого вида.

Цель работы – изучение инфицированности *Borrelia* spp. двух подвидов *I. pavlovskyi* в зонах симпатрии с *I. persulcatus*.

Материалы и методы. Иксодовых клещей (Ixodida, Ixodidae) собирали на флаг с растительности. Обследованы территории Красноярского (пос. Овинный) и Приморского (острова залива Петра Великого: Русский и Попова) краев, где обитают два подвида *I. pavlovskyi*: *I. p. occidentalis* (в Сибири) и *I. p. pavlovskyi* (Дальний Восток). Голодные особи иксодовых клещей исследо-

ваны индивидуально методом ПЦР с использованием тест-системы «Ампли-Сенс® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL». Генотипирование боррелий комплекса видов *Borrelia burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi* проведено путем секвенирования по *clpA* и *p83/100* генам для *B. burgdorferi* s.l. и *p66* гену для *B. miyamotoi*, как описано ранее [10].

Результаты и обсуждения. Как известно, в Приморье *I. pavlovskyi* массово встречается на островах залива Петра Великого: Русском, Попова, Большой Пелис, Елена, Путятина и, гораздо реже, на юге материка [1; 2; 4; 6]. При этом установлено, что вид заселяет острова, где еще относительно недавно отсутствовал.

Обширные зоны симпатрии таежного клеща и *I. pavlovskyi*, известные на территории Западной Сибири [7], дополнены материалами о впервые выявленном (2018 г.) участке массовой встречаемости *I. pavlovskyi* возле пос. Овинного в Красноярском крае (Восточная Сибирь).

Регистрация нового для данной территории вида переносчика возбудителей трансмиссивных инфекций несет потенциальную угрозу изменения спектра циркулирующих в очаге патогенов. В частности, если рассматривать представителей рода *Ixodes*, то изменение структуры их сообщества в зонах симпатрии может повлиять на видовой состав боррелий, привести к регистрации новых патогенов, модификации уровня индивидуальной инфицированности клещей. Поэтому для *I. pavlovskyi*, ареал которого расширяется, важно выявление специфических связей этого вида с теми или иными возбудителями.

По данным исследования клещей, собранных на о. Русском (2015, 2016 гг.), инфицированность особей боррелиями у *I. persulcatus* (исследовано 511 особей, из них заражено 46,0 %) и *I. pavlovskyi* (178; 40,4 %) статистически значимо не различалась. Аналогично не установлены различия в инфицированности клещей боррелиями на о. Попова (2022 г.): зараженность таежного клеща составила 34,3 % (исследовано 70 особей), а *I. pavlovskyi* – 36,4 % (236 особей).

При выявлении маркеров ДНК комплекса видов *B. burgdorferi* s.l. у *I. persulcatus* (69 клещей, из них заражено 42,0 %) и *I. pavlovskyi* (90; 51,1 %), собранных с растительности на территории Красноярского края в 2022 г., статистически значимые различия в инфицированности двух видов переносчиков также не выявлены.

Однако, как показало секвенирование боррелий из особей двух подвидов *I. pavlovskyi* в зонах симпатрии с *I. persulcatus*, этот вид переносчика чаще инфицирован *B. garinii*, а таежный клещ – *B. afzelii* и, особенно, *B. bavariensis* (Рисунок), что подтверждает характер межвидовых различий переносчика по этому показателю, установленный ранее [3; 10]. Вместе с тем ряд исследователей подобных различий на территории Западной Сибири не обнаружили [5].

Показано, что маркеры ДНК *B. miyamotoi* более редко выявляются в Приморье по сравнению с Красноярским краем как в особях таежного клеща (1,4 и 4,8 % соответственно), так и в *I. pavlovskyi* (0,9 и 4,2 %). Межвидовые различия в инфицированности клещей для каждой из территорий отсутствуют.

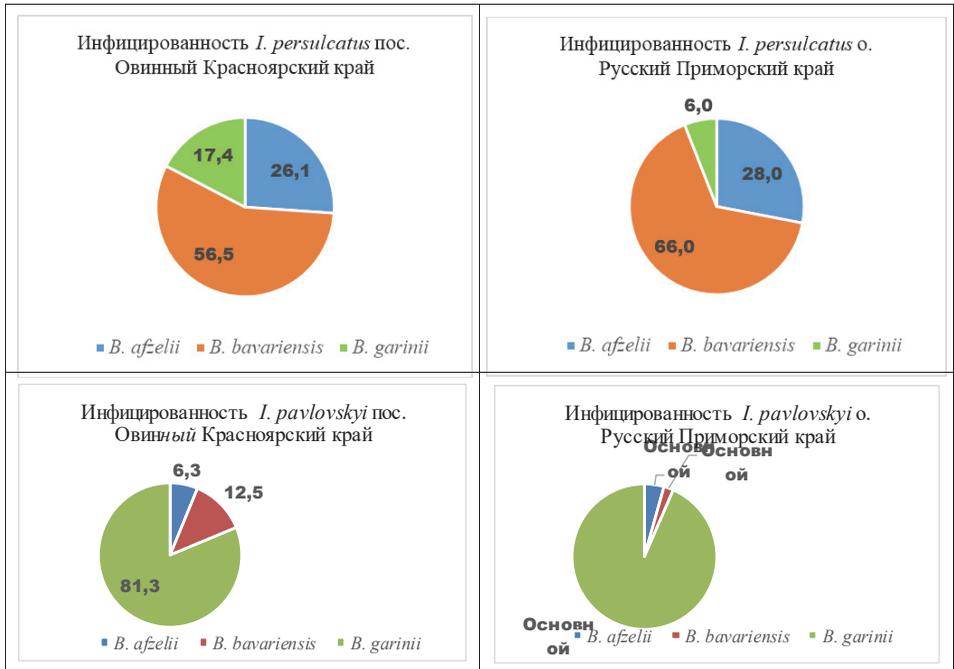


Рис. Уровень инфицированности (от общего числа генотипированных клещей) и генотипы боррелий, выявленные в *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* в зонах симпатрии (генотипирование боррелий проведено для 23 особей *I. persulcatus* и 16 *I. pavlovskyi* из Красноярского края; 50 *I. persulcatus* и 46 *I. pavlovskyi* из Приморского края)

Таким образом, в зависимости от доминирующего в природном очаге вида *Ixodes* люди могут быть заражены разными генотипами боррелий. Соответственно, вслед за сменой циркулирующего в природном очаге этиологического агента болезни, обусловленного изменением структуры сообщества клещей, могут меняться клинические формы регистрируемых боррелиозов, а в зависимости от обилия и зараженности боррелиями того или иного вида переносчиков – и уровень заболеваемости населения.

Список литературы

1. Гордейко Н. С. Клещи семейства Ixodidae Юга Приморья: типы населения, паразито-хозяйные связи, инфицированность патогенами (на примере материковых и островных сообществ) : дис. ... канд. биол. наук. Иркутск, 2019. 166 с.
2. Колонин Г. В. Материалы по фауне иксодовых клещей юга Приморского края // Паразитология. 1986. Т. 20, № 1. С. 15–18.
3. Роль *Ixodes pavlovskyi* (acarî, ixodidae) в боррелиозном эпизоотическом процессе на острове Русском / А. Я. Никитин, Ю. В. Сабитова, В. А. Рап, И. М. Морозов, Н. С. Гордейко, А. В. Алленов, Г. Б. Каверина, И. В. Бабкина, Н. В. Тикуннова, Е. И. Андаев // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 1. С. 116–121.

4. Сагдиева П. Д. Кровососущие клещи (Parasitiformes) млекопитающих заповедных территорий Приморского края : дис. ... канд. биол. наук. Тбилиси, 1984. 296 с.
5. Геновидовое разнообразие боррелий в иксодовых клещах на территории юга Западной Сибири / С. А. Рудакова, О. Е. Теслова, Н. Е. Канешова, С. В. Штрек, В. В. Якименко, Н. А. Пенъевская // Проблемы особо опасных инфекций. 2019. № 4. С. 92–96. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-92-96
6. Филиппова Н. А. Симпатрия близкородственных видов иксодовых клещей и ее возможная роль в паразитарных системах природных очагов трансмиссивных болезней // Паразитология. 1999. Т. 33, № 3. С. 223–241.
7. Якименко В. В., Малькова М. Г., Шпынов С. Н. Иксодовые клещи Западной Сибири: фауна, экология, основные методы исследования. Омск, 2013. 239 с.
8. Multilocus genetic analysis indicates taxonomic status of “*Candidatus Rickettsia mendelii*” as a separate basal group / Y. Igolkina, A. Nikitin, Y. Verzhutskaya, N. Gordeyko, A. Tikunov, T. Epikhina, N. Tikunova, V. Rar // Ticks Tick Borne Dis. 2023. Vol. 14, N 2. 102104. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2022.102104.
9. Kovalev S. Y., Mikhaylishcheva M. S., Mukhacheva T. A. Natural hybridization of the ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in their sympatric populations in Western Siberia // Infect Genet Evol. 2015. Vol. 32. P. 388–395. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.04.003
10. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia / V. Rar, N. Livanova, S. Tkachev, G. Kaverina, A. Tikunov, Y. Sabitova, Y. Igolkina, V. Panov, S. Livanov, N. Fomenko, I. Babkin, N. Tikunova // Parasites & Vectors. 2017. Vol.10.Art. 258. DOI: 10.1186/s13071-017-2186-5.
11. *Ixodes persulcatus/pavlovskyi* natural hybrids in Siberia: Occurrence in sympatric areas and infection by a wide range of tick-transmitted agents / V. Rar, N. Livanova, Y. Sabitova, Y. Igolkina, S. Tkachev, A. Tikunov, I. Babkin, I. Golovljova, V. Panov, N. Tikunova // Ticks Tick Borne Dis. 2019. Vol. 10, N 6. Art. 101254. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.05.020.

УДК 51-76

LIVE DATA AND 3 LAYERS OF EMERGENCE IN SYSTEMS BIOLOGICAL MODEL OF EPIDEMICS: LESSONS FROM COVID-19 AND PREPARATION FOR THE NEXT

A. N. Kolodkin

*Luxembourg Institute of Health, Strassen, Luxembourg
alexey.kolodkin@lih.lu*

Systems Biology aims to understand biological emergence from the interactions of biomolecules, e. g. by integrating the knowledge about these interactions into a computer model and thereby reconstructing biological behavior in silico. In relation to the human, such an in silico replica of the whole body is the so-called Silicon Human. We can add medical aspects to this model and, using the patient's genome, transcriptome, and proteome data, parameterize a Silicon Human for any patient individually (Silicon Patient), thereby propelling individualized medicine of any systems biological disease [1,2].

When dealing with systems biological modeling for epidemiological diseases, we should also consider other layers of emergence. On the one hand, the health-related properties of one individual emerge in the direction from interactions between biomolecules towards the personalized physiological behavior as in the classical silicon patient model [3–5]. On the other hand, from interactions between susceptible, recovered, immune, or infected individuals we may reconstruct in silico the emergence of the epidemics and the spread of virus in a population as in SIRS models [6]. This brings an additional state-dependency of systems components properties. Interactions between biomolecules depend on the presence of other bimolecular components and thus on the state of the whole system on the level of a whole organism, and the latter depends on the interactions with other individuals and thus on the state of the system on the level of a whole population. This state dependency of systems component properties described in terms of mathematical equations is, in fact, the main feature of systems biological models and makes systems biological approach to be reductionism and holism and the same time. It is a reductionism because the emergent behavior is explained in the model in terms of systems components and it is a holism because the reconstruction of emergent behavior requires information about the whole system [7].

There is also a third, already a social level of emergence in building systems biological model of epidemics, where interactions between various institutions collecting different pieces of clinical data should lead towards the emergence of an integrated systems biological model of epidemics. Data collection process becomes state-dependent on the level of the society and data becomes live in a sense that they change with the evolution of the whole system.

In my presentation, I will discuss the efforts towards building this type of system biological model of coronavirus pandemics embracing all 3 levels of emergence discussed above, along with the approaches aiming to facilitate the building of sys-

tems biological models: (i) the so-called domino approach where new biochemical modules are added like domino tiles linked by common metabolites [7] and (ii) the blue-print modeling, where individualized models are considered as instantiations of the same blue-print generic model [8].

The presentation is based on my personal experience in building the Corona-virus SIRS model [6] in collaboration with the Infrastructure for Systems Biology Europe [9] and in the organization of clinical data collection within the ORCHESTRA project (<https://orchestra-cohort.eu/>). The encountered problems and learned lessons will be discussed in the perspectives of preparation for potential epidemics in the future.

References

1. Westerhoff H.V., Kolodkin A.N., Conradie R., Wilkinson S.J., Bruggeman F.J., Krab K., Schuppen van J.H., Hardin H., Bakker B.M., Moné M.J., Rybakova K., Eijken M., Leeuwen H. J. P., Snoep J. L. Systems biology towards life in silico: mathematics of the control of living cells. *J. Math Biol.*, 2009, vol. 58 (1-2), pp. 7–34. DOI: 10.1007/s00285-008-0160-8
2. Kolodkin A.N., Boogerd F.C., Plant N., Bruggeman F.J., Goncharuk V., Lunshof J., Moreno-Sanchez R., Yilmaz N., Bakker B.M., Snoep J.L., Balling R., Westerhoff H.V. Emergence of the silicon human and network targeting drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011. DOI: 10.1016/j.ejps.2011.06.006
3. Kolodkin A.N., Sahin N., Phillips A., Hood S. R., Bruggeman F.J., Westerhoff H.V., Plant N. Optimization of stress response through the nuclear receptor-mediated cortisol signalling network. *Nature Communications*, 2013, vol. 4. DOI: 10.1038/ncomms2799
4. Kolodkin A.N., Prasad Sharma R, Westerhoff HV, Colangelo A.M., Ignatenko A, Mar-torana F., Jennen D., Briede J.J., Brady N., Barberis M., Mondeel T. D. G. A., Papa M., Kumar V., Peters B., Skupin A., Alberghina L., Balling R., Westerhoff H.V. ROS networks: designs, aging, Parkinson's disease and precision therapies. *Syst Biol Appl.*, 2020, vol. 6, no. 34. <https://doi.org/10.1038/s41540-020-00150-w>
5. Kolodkin A.N., Bruggeman F.J., Plant N., Moné M.J., Bakker B.M., Campbell M.J., van Leeuwen J. P. T. M., Carlberg C., Snoep J. L., Westerhoff H.V. Design principles of nuclear receptor signaling: how complex networking improves signal transduction. *Molecular Systems Biology*, 2010, vol. 6, 446. DOI:10.1038/msb.2010.102
6. Westerhoff H.V., Kolodkin A.N. Advice from a systems-biology model of the corona ep-idemics. *Syst Biol Appl.*, 2020, vol. 6, no.18. <https://doi.org/10.1038/s41540-020-0138-8>
7. Kolodkin A.N., Simeonidis E., Balling R., Westerhoff H.V. Computing life: Add logos to biology and bios to physics. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2012, vol. 111(2–3), pp. 69–74. DOI:10.1016/j.pbiomolbio.2012.10.003
8. Kolodkin A.N., Simeonidis E., Balling R., Westerhoff H.V. Understanding complexity in neurodegenerative diseases: in silico reconstruction of emergence. *Frontiers in Systems Physiol-ogy*, 2012, vol. 3. DOI:10.3389/fphys.2012.00291
9. Martins dos Santos V. et al. Systems Biology in ELIXIR: modelling in the spotlight. *F1000 Research*, 2022, vol. 11 (ELIXIR), 1265. <https://doi.org/10.12688/f1000research.126734.1>

УДК 616-03

ВЛИЯНИЕ НАНОФОРМ ПРЕПАРАТОВ С60-L-АРГИНИНА И ДИОКСАДЭТА НА ЧАСТОТУ АНОМАЛЬНЫХ ГОЛОВОК СПЕРМАТОЗОИДОВ И ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У БЕСПОРОДНЫХ МЫШЕЙ

М. А. Корженевская, С. В. Розенфельд, Е. Ф. Того, К. Н. Семенов, В. В. Шаройко

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, г. Санкт-Петербург, Россия
korgmar@rambler.ru*

Antitumor drugs should not have a negative physiological effect on normal dividing cells, but they are highly effective in destroying cancer cells. The creation of new drugs and the study of the mechanism of their influence increases the effectiveness of therapy and improves the prognosis for the life of patients.

Введение. Одной из значимых проблем современной медицины является лечение онкологических заболеваний. Противоопухолевые препараты не должны обладать негативным физиологическим действием на нормальные делящиеся клетки, но высокоэффективно разрушать раковые клетки, сдерживать их рост и пролиферацию. Создание новых лекарственных препаратов и изучение механизма их влияния повышает эффективность терапии и улучшает прогноз для жизни пациентов.

Цель исследования. Изучение влияния двух наночастиц препаратов:

1- «Диоксадэт», цитостатического действия и 2-«С60-L-аргинина» с антиоксидантного действия на частоту возникновения аномальных головок сперматозоидов и на частоту хромосомных aberrаций в клетках красного костного мозга у самцов мышей. Известно, что диоксадэт обладает алкилирующим действием на азотистые основания, благодаря чему может вызывать повреждения ДНК и повышать уровень свободных радикалов в клетках. Препарат С60-L-аргинин, как антиоксидант, напротив, способен связывать образующиеся в клетках свободные радикалы

Материалы и методы. Диоксадэт, согласно номенклатуре ИЮПАК, является водорастворимым веществом из класса алкилирующих агентов – производных триазина [5-[[[4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]амино]-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил]метанол]. С60-L-аргинин является аминокислотным производным фуллерена С-60, способным снижать интенсивность перекисного окисления липидов, а также повышать активность супероксиддисмутазы.

Частоту аномальных головок сперматозоидов (АГС) и хромосомных aberrаций (ХА) изучали на одномесечных самцах беспородных мышей. Было создано четыре группы мышей, по пять самцов в каждой. Первой группе однократно вводили подкожно по 0,2 мл диоксадэта в терапевтической дозе, второй группе – подкожно терапевтическую дозу С60-L-аргинина, третьей контрольной группе подкожно однократно вводили физиологический раствор (NaCl

0,9 %) в дозе 0,2 мл, четвертая группа представляла собой интактный контроль без инъекций.

Оценку частоты АГС проводили с помощью теста на аномалии головок сперматозоидов согласно общепринятой методике, через 16 дней после введения препаратов. Для каждого животного анализировали по 200 сперматозоидов. В качестве аномалий фиксировали укороченные и удлинённые крючки, а также короткие, нитевидные и аморфные головки сперматозоидов.

Частоту ХА анализировали с помощью общепринятой методики (по Ford С. Е.), фиксируя материал через 24 ч после последней из 4-кратных инъекций антиоксиданта (по 0,2 мл х4) в терапевтической концентрации. Определяли общую частоту делящихся клеток с нарушениями митоза любого типа.

Статистический анализ полученных данных проводили методом, рекомендованным для сравнения малых выборок – с использованием t-критерия Стьюдента при уровне значимости 0,05.

Результаты. Частота АГС у мышей, получивших диоксадэт, составляла $23,51 \pm 0,81$ %, что достоверно отличается от группы, получившей инъекцию физиологического раствора ($5,20 \pm 2,80$) и от интактного контроля ($1,70 \pm 0,23$ %). Частота АГС у мышей, получивших С60-L-аргинин, составляла $9,35 \pm 1,59$ %, что достоверно отличается от группы, получившей инъекцию диоксадэта, и от интактного контроля ($1,70 \pm 0,23$ %), но не имеет достоверного различия с группой, получившей инъекцию физиологического раствора.

Частоту ХА у мышей, получивших диоксадэт, определить не представилось возможным, поскольку данный цитостатик полностью подавил деление стволовых клеток красного костного мозга. Частота ХА у мышей, получивших С60-L-аргинин, составляла $13,55 \pm 1,27$ %, что достоверно отличается от интактного контроля ($3,20 \pm 0,86$ %), а также имеет достоверное различие с группой, получившей инъекцию физиологического раствора ($4,17 \pm 0,82$).

Выводы. Таким образом, можно сделать вывод о том, что наноформы препарата «Диоксадэт» влияют на процесс сперматогенеза у мышей и значительно повышают частоту аномалий головок сперматозоидов по сравнению с контролем, одновременно оказывая сильное цитостатическое действие на нормальные соматические клетки. Повышение частоты АГС после подкожного введения диоксадэта не является результатом стресса от инъекции, поскольку достоверно отличается от обеих групп контроля. Наноформы препарата С60-L-аргинин не проявили протекторных свойств в процессе сперматогенеза у самцов мышей, а также не оказали антимуtagenного действия в соматических клетках. Полученные результаты необходимо учитывать при использовании данных препаратов в медицинской практике.

УДК 578.7

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-LACT В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЕЙ ГЛИОМ

Е. В. Кулигина^{1,2}, Н. С. Васильева^{1,2}, А. Б. Агеенко¹, В. А. Рихтер¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
г. Новосибирск, Россия

²ООО Онкостар, Сколково, г. Москва, Россия
kuligina@niboch.nsc.ru

The study is devoted to evaluate the efficacy of a new anticancer drug based on the oncolytic virus VV-GMCSF-Lact for the therapy of malignant neoplasms of the brain with the use of different *in vitro* and *in vivo* tumor models of glioma.

Виротерапия является одним из наиболее активно развивающихся на сегодняшний день подходов для лечения злокачественных новообразований, в том числе глиом. В доклинических исследованиях лекарственный препарат, созданный на базе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, показал высокую противоопухолевую эффективность в отношении опухолей молочной железы человека, в том числе трижды негативных. В настоящее время этот вирусный препарат находится на первой фазе клинических исследований (NCT05376527).

При исследованиях противоопухолевого потенциала VV-GMCSF-Lact в отношении злокачественных новообразований головного мозга было установлено, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой онколитической активностью в отношении клеток как иммортализованных культур глиобластомы человека, так и культур, полученных из образцов опухолей пациентов различной степени злокачественности (персонализированные культуры). Показана также противоопухолевая и антиметастатическая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении ксенотрансплантатов глиобластомы человека *in vivo*.

При внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact иммунокомпетентным крысам с ортотопически трансплантированной глиомой С6 отмечено изменение характера роста опухоли и достоверное уменьшение объемов опухолей по сравнению с контрольной группой. В зависимости от способа введения VV-GMCSF-Lact, наблюдали различной выраженности побочные эффекты как у экспериментальных, так у интактных животных.

Результаты проведенных исследований позволяют рассматривать лекарственный препарат на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины как перспективное противоопухолевое средство для терапии опухолей головного мозга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21–14–00195, <https://rscf.ru/project/21-14-00195/>.

УДК 616.36

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

П. М. Куркутова¹, Ю. К. Плотникова¹, О. А. Пономарева¹,
Г. В. Юринова², А. А. Приставка²

¹*Иркутский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Иркутск, Россия*

²*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
kudo.150414@gmail.com*

A combination of different types of research, such as molecular genetics and biochemical, together provide a more complete picture of the state of the body at the molecular and biochemical level, which is very important when selecting therapy and assessing its effectiveness.

Хронический вирусный гепатит С (ВГС) по-прежнему является серьёзной и распространённой инфекцией, приводящей к высокой заболеваемости и смертности населения во всем мире. Отмечается вовлечение в эпидемию женщин, преимущественно репродуктивного возраста. У женщин с коинфекцией ВГС/ВИЧ перинатальная передача ВГС составляет 15–35 % при сравнительно низкой (3,5–5 %) частоте от матерей с моноинфекцией (в основном зависит от вирусной нагрузки матери) [1; 4]. Повышенный риск передачи ВГС от матери ребенку при материнской коинфекции с ВИЧ объясняется влиянием таких факторов, как изменение иммунитета на плацентарном барьере и изменение плаценты вследствие ВИЧ-инфицирования трофобластов [2], нарушение созревания ворсин с фиброзом стромы, образование фибриноида, приводящего к плацентарной недостаточности и облегчающего проникновение вируса к плоду [4]. На этом фоне возрастает риск передачи ВИЧ и ВГС от матери к ребенку во время беременности и родов [3].

При коинфекции ВИЧ и вирусом гепатита С имеет место ускоренное прогрессирование ВИЧ-инфекции, при этом сопутствующий ВГС может снижать эффективность проводимой антиретровирусной терапии [3]. Поэтому лечение гепатита С является актуальным, а оценка прямых и косвенных маркеров ВГС особенно важно для назначения, мониторинга и оценки эффективности применяемой терапии.

Цель работы: Оценить прямые и косвенные лабораторные маркеры у пациентов с сочетанной вирусной инфекцией.

Объект исследования: группа из 22 пациентов от 12 до 17 лет с хроническим вирусным гепатитом С и ВИЧ-инфекцией. Исследование проводили на базе Центра по борьбе и профилактике СПИД и инфекционных заболеваний (ГБУЗ ИОЦ СПИД), г. Иркутск.

В качестве лекарственной терапии использовали препарат «Мавирет» (Фурнье Лабораториз Ирлэнд Лимитед, Ирландия), представляющий собой комбинацию двух пангенотипных противовирусных средств прямого действия в фиксированных дозах – глекапревира (ингибитора протеазы NS3/4A) и пи-

брентасвира (ингибитора NS5A), воздействующих на различные этапы жизненного цикла вируса гепатита С.

Методы исследования: 1) молекулярно-биологические: выделение нуклеиновых кислот на платформе Freedom EVO Tescan (Швейцария); амплификация с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени – CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США); 2) биохимические: измерение уровня аланин-аминотрансферазы / аспартат-аминотрансферазы на автоматическом биохимическом анализаторе «Architect c8000»; 3) статистические: критерий согласия Пирсона (пакет программ Past v. 4.11).

Результаты

По результатам определения уровня нуклеиновых кислот ВГС все пациенты были разделены на три группы: 1 группа с низкой вирусной нагрузкой (до 10^5 МЕ/мл), 2 группа со средними значениями вирусной нагрузки $4 \cdot 10^5 - 10^6$ МЕ/мл, 3 группа с высокой вирусной нагрузкой ($>10^6$ МЕ/мл). В целом вирусная нагрузка у большинства пациентов определялась как средняя (41 %).

Данные биохимических исследований показали повышение уровня трансаминаз до 3 раз у 68 % детей, у 18 % отмечали среднее повышение (1,5–2 раза), у 14 % пациентов показатели были в пределах референсных значений.

В группе с низкой вирусной нагрузкой уровень трансаминаз был высоким у 66 % пациентов, среднее значение регистрировались у 17 % и нормальные показатели – у 17 % пациентов, во второй группе высокие показатели были у 58 % пациентов, средние значения у 29 % и референсные значения у 13 %, в третьей группе высокие значения регистрировались у 34 % пациентов, средние значения отмечены у 56 % и нормальные показатели у 10 % пациентов (рис. 1).



Рис. 1. Соотношение уровня трансаминаз с вирусной нагрузкой пациентов

Сравнение уровня трансаминаз в трех группах пациентов с разной вирусной нагрузкой показало, что влияние на соотношение разных активностей трансаминаз оказывает только наиболее сильная вирусная нагрузка ($>10^6$ МЕ/мл), при этом увеличивается доля пациентов со средней активностью трансаминаз.

После проведенной терапии препаратом «Мавирет» было показано, что у всех пациентов произошла нормализация уровня трансаминаз, повышение со-

хранялась лишь у двоих детей. На 8-й неделе терапии в 100 % случаев отмечалась элиминация вируса гепатита С у всех пациентов исследуемой группы.

Таким образом, сочетание разных видов исследования таких как молекулярно-генетические и биохимические в совокупности дают более полную картину о состоянии организма на молекулярном и биохимическом уровне, что очень важно при подборе терапии и оценке ее эффективности. Прямые молекулярно-генетические маркеры показывают вирусную нагрузку, косвенные биохимические маркеры являются индикатором функционального состояния печени.

Список литературы

1. Белоусова А. К., Дунайцева В. Н. Инфекционные болезни с курсом ВИЧ-инфекции и эпидемиологии: учебник / под ред. Б. В. Кабарухина. 5-е изд., стер. Ростов н/Д : Феникс, 2011. 245 с.
2. Преемственность в изучении ВИЧ-инфекции в Южно-Уральском государственном медицинском университете / А. А. Аклеев [и др.] // Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. 2016. Т. 2, №3 (14). С. 4–11.
3. Баллаева Ф. Х., Цуккиев З. К. Вирус иммунодефицита человека (обзор литературы) // Молодой ученый. 2019. № 30 (268). С. 21–23.
4. Быстрова Т. Н., Михайлова Ю. В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита С // Медиаль. 2014. № 2(12). С. 88–102.

УДК 579.22

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ К БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМ СОЕДИНЕНИЯМ (НА ПРИМЕРЕ *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* VKM AC-2784D)

Ю. А. Маркова¹, Л. А. Беловежец², А. С. Мороз¹

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

² ИрИХ им. А. Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Россия
juliam06@mail.ru

The purpose of this work was to study the effect of a number of biologically active compounds (colchicine, triethanolamine, atrans, gentamicin and anavidin) on the *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D depending on the nature of the carbon source (glucose, inositol, naphthalene, hexadecane). It was found that the growth rate, biofilm formation and activity of dehydrogenase enzymes differed. This indicates that the carbon source has a significant effect on the strength and nature of the influence of not only antibiotics, but also other biologically active compounds.

Взаимодействие микроорганизмов с биологически активными соединениями (БАС) широко изучается [3]. Эти соединения могут воздействовать на выживаемость бактерий (антибиотики) или изменять их физиолого-биохимические свойства. В то же время получены убедительные данные, что природа источника углерода оказывает значимое влияние на ответные реакции микробной клетки при воздействии БАС [4]. Это явление связано с бактериальным метаболизмом и носит название фенотипическая резистентность. На сегодняшний день фенотипическая резистентность хорошо изучена на примере бактерий и антибиотиков [4].

Мы предположили, что модификация среды культивирования БАС позволит более полно использовать метаболический потенциал микроорганизмов-деструкторов влияя на накопление их биомассы или скорость разрушения поллютантов. Учитывая тот факт, что их действие может различаться в зависимости от состава среды использовали среды с разными источниками углерода. Таким образом, цель данной работы состояла в изучении действия ряда БАС на нефтедеструктор *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D, культивируемый в разных средах.

R. qingshengii VKM AC-2784D был выделен из нефтезагрязненных почв в районе пос. Тыреть, Иркутской области. Данный микроорганизм является эффективным нефтедеструктором и способен снижать негативное действие углеводородов нефти на растения [2]. В качестве биологически активных соединений использовали колхицин (Sigma), триэтаноламин и атраны на его основе, синтезированные в ИрИХ СО РАН, гентамицин и анавидин. Эксперименты проводили на средах МПБ (Оболенск) и минеральной среде 8Е с глюкозой, нафталином, инозитом или гексадеканом (5 г/л) в или без углерода (голодная

среда). Оценивали скорость роста и биопленкообразование в динамике, активность дегидрогеназных ферментов, количество АФК и др.

Отмечено незначительное сокращение лаг фазы у бактерий, культивируемых в МПБ в присутствии атранов. В среде 8E с глюкозой, напротив, наблюдалась стимуляция роста в начале культивирования, а с нафталином влияние атранов было преимущественно неблагоприятным. Воздействие на биопленкообразование было негативным практически на всех средах, особенно в присутствии нафталина.

Колхицин и атраны стимулировали активность дегидрогеназ, особенно у бактерий, культивируемых на среде с глюкозой, что свидетельствует об активации центрального метаболизма углерода. Вероятно, именно это является причиной увеличения скорости роста бактерий и угнетения биопленкообразования. Внесение гентамицина в среду культивирования также приводило к активации клеточных дегидрогеназ и появлению АФК. При этом амплитуда и динамика дегидрогеназной активности на средах с разными источниками углерода различались.

Неблагоприятное воздействие исследуемых веществ (за исключением анавидина) на бактерии, культивируемые в среде с нафталином, возможно, является следствием избыточного накопления АФК не только в результате действия данных веществ, но и в результате деструкции нафталина [1].

Таким образом, установлено, что природа источника углерода оказывает существенное воздействие на силу и характер влияния исследуемых БАС на *R. Qingshengii* VKM AC-2784D. Мы предполагаем, что некоторые БАС, оказывающие стимулирующее воздействие на микроорганизмы, так же как и бактерицидные антибиотики активируют центральный метаболизм углерода. Это способствует ускорению роста и, вероятно, снижению биопленкообразования.

Работа поддержана проектом НИР № гос. регистрации – 122041100050–6.

Список литературы

1. Сазыкин И. С., Чистяков В. А., Сазыкина М. А. Ферментативные и неферментативные механизмы деградации углеводородов нефти микроорганизмами // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2009. № 21. С. 50–57.
2. Третьякова М. С., Беловеж Л. А., Маркова Ю. А. Скрининг бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктировать компоненты нефти // Системы. Методы. Технологии. 2015. Т. 4, № 28. С. 138–142.
3. Schrader S. M., Vaubourgeix J., Nathan C. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it // Science translational medicine. 2020. Vol. 12, N 549. Art. eaaz6992.
4. Alanine enhances aminoglycosides-induced ROS production as revealed by proteomic analysis / Ye J., Su Y., Lin X., Lai S., Li W., Ali F., Zheng J., Peng B. // Frontiers in microbiology. 2018. Vol. 9. P. 29.

УДК 57.084.1+578.71

МОДЕЛЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛЕГКИХ ИЗ МЫШЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ И ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ, АНТИТЕЛ И ТЕРАПЕВТИКОВ ПРИ СОЗДАНИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РАКА

Н. И. Рекославская, А. С. Столбиков¹

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
rekoslavskaya@sifibr.irk.ru*

¹Иркутский государственный университет г. Иркутск, Россия

The rapid testing of immunogenic and oncolytic activities of viral proteins, antibodies and therapeutics on isolated murine lungs has been done for the development of the therapeutic vaccine against cancer. The study included the action of «early» and «late» proteins of high-risk papillomavirus type 16, periferic blood antiserum of vaccinated mice after oral administration of vaccine made on the basis of transgenic tomato with the «early» gene *hpvE2*. The induction of tumor formation by cancer HeLa cells, Elisa, Elispot, western blotting and microscopy analyses were employed in the investigation.

Иммунный надзор над возникновением и развитием опухолей является острой необходимостью в борьбе с канцерогенезом и не менее важны способы быстрой оценки онколитиков и иммуногенов, применяемых для терапии рака. По данным ВОЗ, в 2022 г. возникло около 20 млн новых случаев рака, при этом половина из них закончилась смертельным исходом. Ежегодно прирост заболеваний раком увеличивается на 5–10 %, что означает до 500 смертей пациентов в день. Рак легких является наиболее агрессивным типом рака, на его долю приходится до 7 % смертей от всех раковых заболеваний, причем в 5-летний период послеоперационного выживания остаются живыми только 12–18 % пациентов. Причинами тяжелого протекания канцерогенеза в легких рассматривают природные качества структур их составляющих, например, секрецию Т лимфоцитов-регуляторов из кровотока в легкие, что способствует понижению иммунитета легких, наличие сурфактантов на эпителии легких, синтезируемых альвеолоцитами II порядка, которые первыми воспринимают «удар» окружающей среды и поэтому вынуждены занижать иммунный ответ легких в целях сохранения их структур, а также тормозить цитокиновый «шторм». Именно это свойство природного занижения иммунного ответа при действии внешних факторов на легкие позволило нам создать модель опухолеобразования в легких мышей при действии раковых клеток HeLa, чтобы затем иметь возможность воздействия различных иммуногенных антигенных белков и онколитиков терапевтического ряда с целью торможения или регрессии опухолей (рис. 1, В, Г).

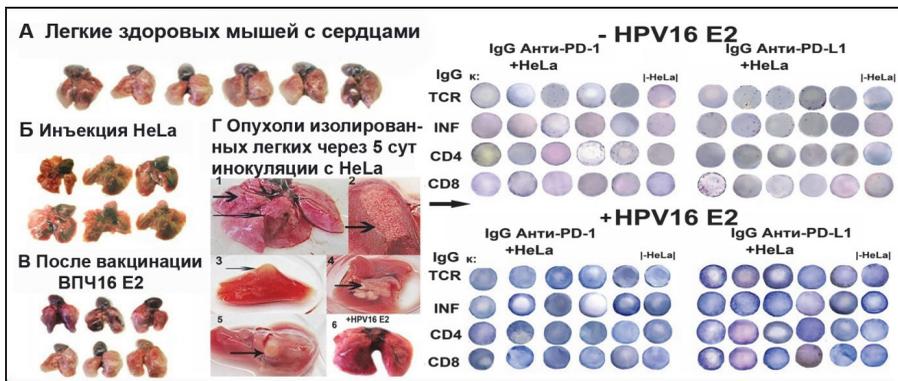


Рис. 1. Действие вакцинации антигенным белком вируса папилломы человека HPV16 E2 на опухоли легких мышей (А, Б, В, Г) (слева) и индукция синтеза Т клеточного рецептора (TCR), интерферона (INF), CD4 и CD8 Т лимфоцитов, выделенных из легких мышей, инокулированных с клетками HeLa, в присутствии в качестве активатора HPV16 E2 и антител к опухолевому рецептору чек-пойнту PD-L1 (справа)

Инъекция суспензии клеток HeLa в бедро мыши или инокуляция изолированных легких с HeLa приводила к образованию разнообразных опухолей, причем *in vitro* образующиеся опухоли были аналогичны мелкоклеточной саркоме легких, агрессивной и быстро развивающейся уже через 1 сут после инокуляции (рис. 2, вверху). Внесение антигенного белка HPV16 E2 совместно с клетками HeLa отменяло канцерогенез в легких и паттерны клеток и тканей легких были нормальными без перехода к делению и без формирования пластов гиперхромных опухолевых разрастаний (рис. 2, внизу). При вакцинировании растительной вакциной на основе трансгенного томата с геном HPV16 E2 в крови и спленocyтaх происходило весьма значительное увеличение синтеза интерферона, Т клеточного рецептора (TCR), генерации CD4 и CD8 Т лимфоцитов, а также активация ферментов апоптоза: гранзима В, перфорины и гранулизына. В Т лимфоцитах легких из мышей, инокулированных с HeLa, после обработки антителами к чек-пойнту PD-L1 (раковому иммунному рецептору) происходила активация синтеза TCR, интерферона и CD4/CD8 Т лимфоцитов (рис. 1, справа).

Терапевтические белки – иммуногенные онколитики: оксидазы L- и D-аминокислот вызывали регрессию опухолей легких, инициированных HeLa, при этом происходил высокоэффективный иммунный ответ в виде синтеза интерферона и активации ферментов апоптоза: гранзима В, перфорины и гранулизына. Тестирование иммуногенов, онколитиков и антител длится 5–7 сут (включая Элиспот) на опухолях изолированных легких, развивающихся уже через сутки инокуляции с HeLa.

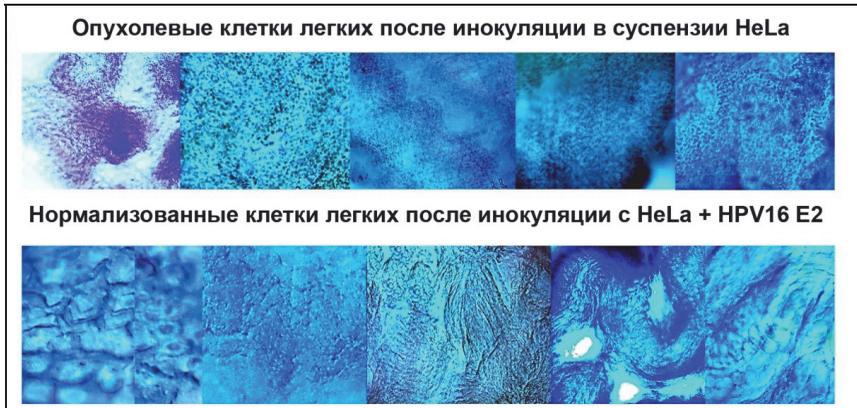


Рис. 2. Паттерны микротомных срезов опухолей изолированных легких через 2 сут после инокуляции с клетками HeLa (вверху, мелкоклеточные опухоли с гиперхромными ядрами) и паттерны микротомных срезов нормализованных тканей при действии HPV16 E2 в момент инокуляции с клетками HeLa (внизу, слева направо: пластинчатые клетки периферийной паренхимы, длинноволокновые мускульные клетки, бронхиолы). Окрашено: гематоксилин по Carazzi. Световой микроскоп $\times 850$

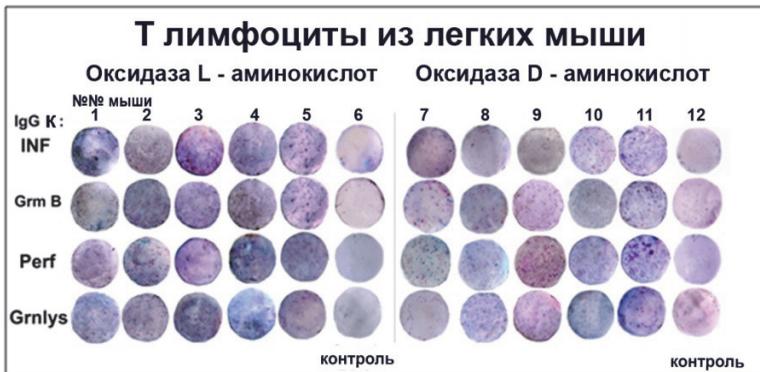


Рис. 3. Активация иммунного ответа в T лимфоцитах легких из мыши, инокулированных с клетками HeLa, при внесении терапевтических иммуногенных онколитиков: оксидазы L-аминокислот и оксидазы D-аминокислот в питательную среду с T лимфоцитами

УДК 577.21:616.9

ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАГОУСТОЙЧИВОСТИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* НА ОСНОВЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУР CRISPR/CAS СИСТЕМ В ИХ ГЕНОМАХ

Л. А. Степаненко¹, Б. Г. Сухов², Т. В. Конькова², В. В. Бединская¹,
Н. В. Клушина², В. И. Злобин¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

²Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского СО РАН,
Новосибирск, Россия
steplia@mail.ru

The paper presents studies of CRISPR/Cas systems of antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. An analysis of the structural and functional features of CRISPR/Cas systems made it possible to obtain information both about the evolutionary history of microorganisms and about bacteriophages against which their action is directed, that is, about their phage resistance.

Klebsiella pneumoniae относится к группе бактерий-оппортунистов, обладающих способностью формировать пан-лекарственную устойчивость и передавать ее другим бактериям посредством горизонтального переноса генов [1; 2]. Данные исследования посвящены изучению структурного и функционального разнообразия CRISPR/Cas систем, защищающих бактерии от инородной ДНК. Их анализ на примере антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* даст возможность продемонстрировать фагоустойчивость исследуемых бактерий и позволит разработать подходы в лечении сложных инфекционных заболеваний путём создания таргетной фаговой терапии.

Цель. Провести поиск и анализ структур CRISPR/Cas систем для скрининга бактериофагов через спейсеры CRISPR-кассет на примере штаммов *Klebsiella pneumoniae*, обладающих антибиотикорезистентностью.

Материалы и методы. Для анализа из GenBank были выбраны 50 полногеномных последовательностей *Klebsiella pneumoniae*, в геноме которых были определены CRISPR/Cas системы. Из них у 29 штаммов, что составило 58 %, были определены гены устойчивости к антибактериальным препаратам (по данным NCBI), они и послужили объектом исследования. Для поиска локусов CRISPR/Cas систем и генов Cas, определения их функциональных и структурных характеристик использовали три программных метода моделирования: Macromolecular System Finder (MacSyF, ver. 1.0.2), с вспомогательными пакетами makeblastDB (ver. 3.0) и HMMER (ver. 2.2.28), и онлайн доступных софтов: CRISPRCas Finder и CRISPROne. Для поиска фагов, расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение CRISPRtarget.

Результаты и обсуждение. В геноме исследуемых штаммов были определены гены устойчивости к антибактериальным препаратам. Из них 90 % имели устойчивость к β-лактамам (карбапенемаза), и по 5 % к рифампицину и три-

метоприм-сульфаметоксазолу. В их CRISPR/Cas системах определено наличие одной и двух CRISPR-кассет. Рядом с кассетами идентифицирован полный набор Cas-генов, характерный для систем Type-I Subtype-I-E, что свидетельствует о функциональной активности CRISPR/Cas систем, т. е. их способности к приобретению новых спейсеров, транскрипции CRISPR-кассет, распознаванию и уничтожению чужой ДНК. Определено два вида консенсусных последовательностей повторов всех найденных CRISPR-кассет. Это указывает на наличие определенного типа CRISPR/Cas системы (в нашем случае это Type-I Subtype-I-E) и на стабильность ее работы, так как именно данные повторы распознаются белками эндонуклеазы Cas, действие которых направлено на разрезание и разрушение мишени. Пять штаммов обладали множественной антибиотикоустойчивостью и были определены как пан-резистентные. Филогенетический анализ позволил подтвердить единое происхождение четырех из пяти штаммов, выделенных в разное время и в разных регионах мира, но обладающих идентичным спейсерным составом CRISPR-кассет. Скрининг спейсерных последовательностей CRISPR-кассет антибиотикорезистентных штаммов установил наибольшее их соответствие протоспейсерам фагов бактерий рода *Klebsiella*, *Salmonella*, относящихся к одному семейству *Enterobacteriaceae*. С помощью использованных программ удалось определить полное название бактериофагов и их номер доступа в GenBank. Также в CRISPR-кассетах данных штаммов было отмечено соответствие участка одного спейсера протоспейсерам нескольких фагов. Можно предположить, что бактерия «разумно» одним спейсером защищается от нескольких фагов. Таким образом, анализ структурных и функциональных особенностей CRISPR/Cas систем антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* позволил получить информацию об их эволюционной истории и о бактериофагах, против которых направлено их действие, т. е. об их фагоустойчивости. Данный подход в дальнейшем может быть использован как платформа для создания таргетной фаготерапии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00449, <https://rscf.ru/project/22-25-00449/>

Список литературы

1. Агеев В. А., Агеев И. В., Сидоренко С. В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 450–460. DOI: 10.15789/2220–7619-COM-1825
2. Whole genome assembly and functional portrait of hypervirulent extensively drug-resistant NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* of capsular serotype K2 and ST86 / Y. Liu, D. Long, T. X. Xiang, F. L. Du, D. D. Wei, L. G. Wan, Q. Deng, X. W. Cao, W. Zhang // J. Antimicrob. Chemother. 2019. Vol. 74, N 5. P. 1233–1240. DOI: 10.1093/jac/dkz023

УДК 574.24:57.033+632.95.02:[591.39+612.64]

**IN UTERO ВОЗДЕЙСТВИЕ ХЛОРИДА КАДМИЯ
НА ПОЛНОГЕНОМНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК
12-ДНЕВНЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ:
МЕЖГЕНЕРАЦИОННОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ
ЭПИГЕНОМНОГО ЭФФЕКТА**

И. О. Сучкова, Е. М. Нониашвили, Н. И. Дергачева, Е. Л. Паткин

*Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, Россия
irsuchkova@mail.ru*

It has been shown that cadmium chloride affects DNA methylation in 12-day-old mouse embryos. It is assumed that this pollutant change the epigenomic marks in germline cells depending on the sex. Epigenetic changes that arise in both females and males are inherited for three generations.

Введение. Кадмий способен биоаккумулироваться в различных органах и тканях. Он является фактором риска возникновения различных патологий [2; 4; 7]. К основным механизмам токсичности этого тяжелого металла относятся: аберрантные эпигенетические модификации, окислительный стресс и повреждения ДНК [5; 6]. В настоящее время мало работ о влиянии кадмия на метилирование ДНК в эмбриональный период, вызванных им эпимутаций и возможности их наследовании между поколениями [1; 8].

Цель. Определить в ряду поколений уровень полногеномного метилирования ДНК у эмбрионов, подвергшихся в F1 воздействию хлорида кадмия во время беременности.

Материалы и методы. Работу проводили на 10–12 недельных мышах-гибридах (F1CBAx57BL) (табл. 1). Беременным самкам F0 из группы «Хлорид кадмия» в течение 3 дней внутрибрюшинно вводили 0,1 мл раствора CdCl₂ в дозе 10 мкМ/мышь. Контрольным самкам F0 инъецировали 0,1 мл 0,9 % NaCl. Условные названия направлений наследования эпигеномного эффекта токсиканта в F2: «*Материнское наследование*» (♀F1CdCl₂x♂_{интактн}), «*Отцовское наследование*» (♀_{интактн}x♂F1CdCl₂) и «*Двойное наследование*» (♀F1CdCl₂x♂F1CdCl₂). Для получения F3 в соответствующих линиях скрещивали самок F2CdCl₂ с самцами F2CdCl₂. Геномную ДНК выделяли из гомогенатов 12-ти дневных эмбрионов методом бесфенольной хлороформной экстракции. Количественную оценку полногеномного метилирования ДНК по CCGG сайтам делали по протоколу *Methylation Sensitive Restriction-ImageJ Assay* [3]. Статистическую обработку проводили с использованием непараметрических критериев Крускала – Уоллиса и Данна.

Таблица 1

Количество животных в исследованных группах

Контроль			Хлорид кадмия								
Самки (матери), N	Эмбрионы		Материнское наследование			Отцовское наследование			Двойное наследование		
			Самки (матери) , N	Эмбрионы		Самки (матери) , N	Эмбрионы		Самки (матери) , N	Эмбрионы	
	Покло- ление	N		Покло- ление	N		Покло- ление	N		Покло- ление	N
5	F1	44	4	F1	24	4	F1	24	4	F1	24
4	F2	24	4	F2	23	4	F2	21	4	F2	25
4	F3	22	4	F3	21	4	F3	26	4	F3	27

Результаты и обсуждение. В контроле выявлены межгенерационные изменения уровня полногеномного метилирования ДНК: у эмбрионов в F2 и F3 он был снижен в 1,2 раза по сравнению с F1 ($p < 0,001$), что может объясняться эпигеномным фоном, специфичным для линий мышей C57BL/6 и C57BL/6J. У эмбрионов F1, подвергшихся *in utero* воздействию CdCl₂, не обнаружено различий в уровне метилирования ДНК по сравнению с контролем F1 ($p = 0,121$), тогда как в F2 и F3 выявлен эпигеномный эффект CdCl₂, который имел разную направленность в зависимости от пола особи, подвергшейся влиянию токсиканта. Так, при материнском наследовании метилирование ДНК было повышено примерно в 1,1 раза у эмбрионов F2 ($p = 0,002$) и F3 ($p < 0,001$) по сравнению с F1CdCl₂. По сравнению с соответствующими интактными контролями у этих эмбрионов метилирование возросло в 1,2 раза для F2 ($p < 0,001$) и в 1,3 раза для F3 ($p < 0,001$). В то же время при отцовском наследовании эпигеномных меток, возникших в F1 в результате воздействия CdCl₂, метилирование ДНК было снижено в 1,1 раза у потомков F2CdCl₂ ($p < 0,001$) и повышено в 1,1 раза у эмбрионов F3CdCl₂ ($p < 0,001$) по сравнению с F1CdCl₂. Хотя по сравнению с соответствующими интактными контролями метилирование было повышено в 1,04 раза в F2CdCl₂ ($p < 0,001$) и в 1,3 раза в F3CdCl₂ ($p < 0,001$). В случае двойного наследования эпигеномного эффекта CdCl₂ наблюдался смешанный характер наследования, включающий в себя черты как материнского, так и отцовского наследования. По сравнению с F1CdCl₂ не обнаружено различий в уровне полногеномного метилирования ДНК у потомков F2CdCl₂ ($p = 0,058$), тогда как у эмбрионов F3CdCl₂ оно было выше в 1,1 раза ($p < 0,001$). Хотя по сравнению с соответствующими интактными контролями метилирование ДНК было повышено в 1,1 раза в F2CdCl₂ ($p < 0,001$) и в 1,3 раза в F3CdCl₂ ($p < 0,001$).

Межгенерационные различия эпигеномного эффекта CdCl₂ при материнском, отцовском и двойном наследовании, вероятно, связаны с «гендерными» особенностями влияния CdCl₂ на эпигеномные метки клеток зародышевого пути [5; 6]. Предполагается, что именно в эмбриональный период CdCl₂ через эпигенетические механизмы (в частности метилирование ДНК) модифицирует экспрессию генов, ответственных за развитие плода, метаболизм половых гормо-

нов, а также болезней, возникающих в отдаленный период у взрослого организма [2; 4; 5; 7; 8].

Закключение. CdCl₂ влияет на метилирование ДНК 12-дневных эмбрионов мыши и, по-видимому, способен изменять эпигеномные метки в клетках зародышевого пути в зависимости от пола животного. Возникшие как у самок, так и самцов эпигенетические изменения могут наследоваться как минимум в течение трёх поколений.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ НИР № FGWG-2022-0012 (рег. № НИОКТР 122020300196-4).

Список литературы

1. Особенности развития доимплантационных зародышей мышей в присутствии малых доз хлористого кадмия *in vitro* / Е. М. Нониашвили, В. Ч. Чан, Н. А. Грудинина, Г. А. Софронов, А. Т. Епринцев, Е. Л. Паткин // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2019. №1. С. 48–55.
2. Паткин Е. Л. Павлинова Л. И., Софронов Г. А. Влияние экотоксикантов на эмбриогенез и гаметогенез млекопитающих. Эпигенетические механизмы // Биосфера. 2013. Т. 5, №4. С. 450–472.
3. Влияние бисфенола а на уровень полногеномного метилирования ДНК в разных частях тела мыши на 12 день эмбрионального развития / И. О. Сучкова, Е. М. Нониашвили, Н. И. Дергачева, В. Ч. Чан, Л. К. Сасина, Т. В. Баранова, Г. А. Софронов, Л. А. Джапаридзе, Е. Л. Паткин // Региональная экология. 2018. Т. 53, №3. С. 96–110.
4. Chandravanshi L., Shiv K., Kumar S. Developmental toxicity of cadmium in infants and children: a review // ЕАН. 2021. Vol. 36, N 1. e2021003.
5. Geng H-Xia. Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development / H-Xia Geng, L. Wang // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2019. Vol. 67, N 3. P. 102–107.
6. Chronic exposure to cadmium induces differential methylation in mice spermatozoa / W. N. Saintilnord [et al.] // Toxicol. Sci. 2021. Vol. 180, N 2. P. 262–276.
7. Şensoy E. Investigation of the effect of cadmium chloride applied during pregnancy on the morphological parameters of mouse offspring and the protective role of melatonin // J. Hazardous Materials Advances. 2023. Vol. 9. e100222.
8. Cadmium disturbs epigenetic modification and induces DNA damage in mouse preimplantation embryos / J. Zhu [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2021. Vol. 219. e112306.

УДК 579.61

ПОИСК CRISPR-CAS СИСТЕМ И ПРОТОСПЕЙСЕРОВ ФАГОВ В ШТАММАХ *E. COLI*

Г. А. Тетерина¹, Д. А. Рыбакова¹, Н. А. Арефьева^{1,2}, Ю. П. Джиев²,
В. П. Саловарова¹

Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия
galina.teterina.91@mail.ru

This study examines the bioinformatic search and analysis of CRISPR-Cas systems of the most pathogenic strains of *E. coli* – O157, O145:H28, O157:H7. The data obtained can be used to develop phage therapy drugs, since representatives of these strains are highly resistant to antibiotic therapy.

Кишечная микробиота человека представляет собой совокупность многочисленных видов бактерий, которые выполняют метаболические и иммунологические функции в населяемой экологической нише. Однако при ряде факторов, например, таких как употребление антибиотиков или попадание инфекционных возбудителей, состав биотопа кишечника может значительно измениться, что приводит к дисбиозу и, как следствие, к нарушению экологического равновесия в желудочно-кишечном тракте [1].

Одной из основных причин нарушения кишечной микробиоты являются патогенные штаммы *Escherichia coli*, которые вызывают различные кишечные инфекции. Антибиотикотерапия из-за множественной устойчивости бактерии становится неэффективной и является причиной возникновения новых высоко патогенных форм бактерий. Поэтому, чтобы вернуть прежние позиции в области антибактериальной терапии, необходимы новые подходы к поиску и созданию эффективных способов и технологий борьбы с патогенными микроорганизмами. Особый интерес в этой области представляют исследования приобретенного в ходе эволюции прокариот специфического адаптивного иммунитета к бактериофагам под названием CRISPR-Cas. Изучение CRISPR-Cas систем между близкими и отдаленными видами открывает новые горизонты в фаговой терапии, направленной на лечение заболеваний кишечной микробиоты, с учетом индивидуальных параметров пациента [2].

Целью данной работы является биоинформатический поиск и анализ CRISPR-Cas систем наиболее патогенных штаммов *E. coli* – O157, O145:H28, O157:H7 с возможностью дальнейшей разработки препаратов фаговой терапии.

Для детекции CRISPR-кассет с целью повышения точности результатов применяли несколько программных алгоритмов в поиске повторов и определении границ повтор-спейсеров в CRISPR-последовательности: CRISPRFinder, CRISPRDetect, CRISPRmap. Поиска кластера генов *cas* осуществляли с помощью программ CRISPRCasFinder, CRISPROne. Тип CRISPR-Cas системы определяли согласно данным программы CRISPRminer. Поиск соответствующих

бактериофагов к спейсерам осуществляли в базах данных PhagesDB, NCBI, ENA и программах CRISPRTarget, BLASTn.

При изучении CRISPR-Cas систем у штаммов *Escherichia coli* O157, O157:H7, O145:H28 исследуемые последовательности геномов были выбраны из международной базы данных NCBI.

В ходе исследования было отобрано 5 полногеномных последовательностей *Escherichia coli* O157, 22 – *E. coli* O157:H7, 9 – *E. coli* O145:H28.

Во всех исследуемых штаммах была выявлена CRISPR-Cas система I класса, I типа, подтипа I-E. Кластер *cas* генов везде был представлен в полном составе (рис. 1).



Рис. 1. Устройство CRISPR-Cas системы I-E подтипа у *E. coli* O157, O157:H7, O145:H28.

При изучении геномных последовательностей *Escherichia coli* O157:H7, было выявлено 27 совпадений спейсеров к участкам геномов фагов.

Самым часто встречаемым фагом для данного штамма оказался *Listeria*, на которого приходится 55,6 %. Наличие иммунитета к нему может быть связано с тем, что этот вирус направлен на одноименный род бактерий, который широко обитает во внешней среде. Вторым по встречаемости оказался фаг *Campylobacter*, на которого приходится 18,5 %. Данный фаг поражает бактерий вида *Campylobacter*, которые часто являются возбудителями заболеваний для животных и человека, вероятно, иммунитет был приобретен при заражении. Третья группа соответствия фагов представлена *Cyanophage S-RIM12*, который обнаруживался с частотой 11,1 %. Этот вирус направлен на цианобактерий, обитающих в воде и почве, поэтому устойчивость к ним приобретена предположительно в естественных условиях. Четвертую группу составляют редко встречающиеся фаги *Staphylococcus phage*, *Pseudomonas phage*, *Isaria javanica chrysovirus*, *Escherichia phage*, на каждого из которых приходится по 3,7 %. Иммунитет к *Staphylococcus phage* может быть обусловлен широкой встречаемостью в естественных условиях и кишечной микробиоте. Иммунитет к *Pseudomonas phage*, который направлен на бактерий рода *Pseudomonas*, может быть сформирован несколькими путями – при встрече в естественных условиях, поскольку данные бактерии широко распространены в природе, а также при заражении человека. Устойчивость к вирусу *Escherichia* также может быть приобретена как в естественных условиях, так и при заражении человека. Единичное соответствие спейсера *Escherichia phage* может указывать на то, что хотя этот вирус и является типичным для исследуемого штамма, но он не часто заражает бактерию. Характерной чертой всех этих фагов является патогенность для других болезнетворных бактерий, что может служить агентом в создании препаратов фаговой терапии.

При изучении геномных последовательностей штамма *Escherichia coli* O157, было выявлено 13 совпадений спейсеров к участкам геномов фагов. Самым часто встречающимся фагом для данного штамма оказался *Bacillus* на который приходится 46,2 %. Этот вирус поражает бактерий рода *Bacillus*, которая широко распространена в почве, входит в состав нормальной микрофлоры толстой кишки человека, а некоторые его виды являются патогенными. Поэтому иммунитет к данному бактериофагу мог сформироваться как путем встречи в естественных условиях, так и при заражении людей. Второй по встречаемости оказался *Campylobacter phage*, который обнаруживался с частотой 38,5 %. Как было описано выше, скорее всего, иммунитет был приобретен при заражении человека. Третью группу составили вирусы *Staphylococcus* и *Streptomyces*, которые были обнаружены в единственном экземпляре. На каждого из них приходится по 7,7 % встречаемости. Как было описано выше иммунитет к *Staphylococcus* может быть приобретен в естественных условиях или при попадании в человеческий организм. Фаг *Streptomyces*, направлен на бактерий одноименного рода, которые широко распространены в почве, морской воде, и иногда выступают в роли патогена для человека. Поэтому устойчивость к данному вирусу может быть сформирована как в естественных условиях, так и при заражении человека.

При исследовании геномных последовательностей *Escherichia coli* O145:H28 обнаружено 15 совпадений спейсеров к участкам геномов фагов. Все спейсеры были идентичны *Escherichia phage 500465-2*. Скорее всего, подобный иммунитет обусловлен тем, что все образцы исследуемого штамма были выделены из фекалий человека.

Таким образом, идентификация и поиск CRISPR-cas систем с помощью биоинформатических методов позволяют достаточно точно проводить анализ на наличие специфического адаптивного иммунитета представителей кишечной микробиоты. Полученные результаты работы являются неотъемлемой частью современного биотехнологического процесса разработки и создания препаратов фаговой терапии кишечных инфекций и дисбиозов человека.

Список литературы

1. Bioengineered *Escherichia coli* Nissle 1917 for tumour-targeting therapy / Y. Xiaoli [et al.] // *Microbial biotechnology*. 2020. Vol. 13, Iss. 3. P. 629–636.
2. CRISPR-Cas: Adapting to change / S. A. Jackson [et al.] // *Science*. 2017. Vol. 356, N 6333. eaal5056.

УДК 612.39

НУТРИГЕНОМИКА И ИСКУССТВЕННЫЙ ИНТЕЛЛЕКТ В БИОМЕДИЦИНЕ – НОВЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ И ГОРИЗОНТЫ

А. С. Уткина, В. П. Карагодин

*Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова, г. Москва, Россия
ytkinaas@yandex.ru*

В течение нескольких последних лет на кафедре товароведения и товарной экспертизы РЭУ им. Г. В. Плеханова проводятся исследования функциональных ингредиентов (ФИ) пищевых продуктов с акцентом на создание доказательной базы для обоснования их эффективности [1]. Основным инструментом этих работ является нутригеномика – область геномики, анализирующая влияние пищевых веществ на экспрессию генов. В результате для таких ФИ, как креатин, кофеин, ВСАА, концентрат сывороточного белка, витамин Д, бета-глюканы существенно уточнены протоколы применения, включая зависимости доза-эффект, длительности воздействия на биологические объекты до достижения желаемого эффекта, учет генетического полиморфизма и т. п. Очевидны длительность и большая трудоемкость соответствующих процедур, реализуемых *in vivo* и *in vitro*, с обоснованием выбора генов-мишеней и/или использования транскриптомного анализа с достаточно сложной интерпретацией полученных данных.

В этой связи с учетом продолжающегося поиска природных источников эффективных и безопасных ФИ наше внимание привлекли возможности бурно развивающихся разновидностей искусственного интеллекта (ИИ), позволяющего перенести акцент молекулярно-генетических исследований на уровень *in silico*. Одним из таких направлений, ранее описанных за рубежом [2] и уже осваиваемых в России, является новая парадигма скрининга ФИ, а именно переход от традиционного алгоритма подтверждения наличия лечебно-профилактического эффекта у выбранного для изучения объекта к иной стартовой точке процесса поиска, когда желаемое действие ФИ на организм задается предварительно. При предлагаемом подходе новым инструментом является ИИ с глубоким обучением на основе структурированных и неструктурированных данных (датасетов), включая научные публикации (особенно по фудомике), патенты, блоги, социальные сети и т. п. Таким образом, итеративный процесс обучения ИИ приводит к предсказанию существования в сырьевых источниках (главным образом растительных) биологически активных веществ с заранее заданными оздоровительными свойствами.

В настоящее время описанная выше методология применяется на кафедре товароведения и товарной экспертизы РЭУ для обнаружения индивидуальных флавоноидов (представляющих такие классы, как флавоны, флавонолы, изофлавоны) противовоспалительного действия с перспективой их применения в качестве ФИ. Представляется несомненным, что ИИ существенно расширяет возможности предсказать как наличие, так и отсутствие ожидаемых свойств у

изучаемых объектов, а также сократить обозреваемый перечень их сырьевых источников и, в конечном счете, существенно снизить временные и материальные затраты на поиск веществ, способных эффективно ингибировать воспаление и оказывать другое оздоровительное действие.

Другой новой возможностью применения ИИ в нутригеномике являются т. н. сверточные нейронные сети, представляющие собой модели глубокого обучения для обработки больших данных по экспрессии генов, что позволяет проводить скрининг целевых лекарственных препаратов и быстро получать другие важные биомедицинские результаты [3–5].

Например, ИИ-идентификация геновых сетей, ассоциированных с конкретными патологиями, продемонстрирована в работе [6] при анализе экспрессии 20000 генов. Показано, что ИИ позволяет на основе неструктурированных данных производить в автоматическом режиме группировку биологически значимых генов-мишеней.

Отметим, что к настоящему времени было предложено несколько разновидностей ИИ с машинным обучением для динамического моделирования данных омик-технологий. Несмотря на несомненные достоинства таких подходов (точность, успешное прогнозирование), большинство этих моделей основано на алгоритмах «черного ящика», тогда как научное сообщество склонно к более понятной логике умозаключений и интерпретации результатов. В этой связи создан «объяснимый» ИИ (eXplainable Artificial Intelligence), применяемый совместно с интеллектуальным анализом данных (data mining) для изучения цепных биологических процессов, в частности, экспрессии генов, инициирующих ожирение и другие патологии [7]. К сожалению, несмотря на определенные успехи в развитии ИИ в России, его применению в фармакогеномике и нутригеномике требуются дополнительные стимулы.

Список литературы

1. Уткина А. С., Карагодин В. П. Коммерчески доступные глюканы разного сырьевого происхождения – оптимизация использования с позиций нутригеномики // *Индустрия питания*|Food Industry. 2023. Т. 8, № 2. С. 6–12.
2. Artificial Intelligence in Functional Food Ingredient Discovery and Characterisation: A Focus on Bioactive Plant and Food Peptides / A. Doherty, A. Wall, N. Khaldi, M. Kussmann // *Front. Genet.* 2021.12.768979.
3. Network systems pharmacology-based mechanism study on the beneficial effects of vitamin D against psychosis in Alzheimer’s disease / P. Fan, X. Qi, R. A. Sweet, L. Wang // *Sci. Rep.* 2020. Vol.10.P. 6136.
4. Artificial intelligence and machine learning approaches using gene expression and variant data for personalized medicine / S. Vadapalli, H. Abdelhalim, S. Zeeshan, Z. Ahmed // *Brief Bioinform.* 2022. Vol. 23, N 5.
5. Wilentzik M. R., Gat-Viks I. Exploring Neural Networks and Related Visualization Techniques in Gene Expression Data // *Front. Genet.* 2020. Vol.11.P. 402.
6. Deriving disease modules from the compressed transcriptional space embedded in a deep autoencoder / K. Sanjiv [et al.]. // *Nature Communications.* 2020.
7. eXplainable Artificial Intelligence (XAI) for the identification of biologically relevant gene expression patterns in longitudinal human studies, insights from obesity research / A. Anguita-Ruiz, A. Segura-Delgado, R. Alcalá, C. M. Aguilera, J. Alcalá-Fdez // *PLoS Comput Biol.* 2020. Vol. 16, N 4. e1007792.

УДК 575.5

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВИРУСА ОЗ

**М. Ю. Щелканов, А. А. Белик, О. В. Иунихина, А. Б. Потт, Ю. А. Белов,
Е. В. Персиянова, П. Г. Милованкин, Н. В. Крылова**

*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова Роспотребнадзора,
г. Владивосток, Россия
adorob@mail.ru*

The investigations of whole genome sequences of Oz virus is actual due to new data on the pathogenicity of this virus for humans. We designed a set of 26 pairs of primers with the lengths of amplified fragments from 228 to 576 b. p.

Вирус Оз (OZV – Oz virus) (Articulavirales: Orthomyxoviridae, *Thogotovirus*) был впервые описан в 2018 г. [9]. OZV был изолирован на модели культуры клеток Vero из голодных иксодовых клещей *Amblyomma testudinarium* (Ixodida, Parasitiformes: Ixodidae), собранных в 2013 г. с травянистой растительности в условиях влажного субтропического климата в юго-западной лесистой части японской префектуры Эхиме (о. Сикоку), в окрестностях города Озу. В поддержании циркуляции этого вируса участвуют пятнистые олени (*Cervus nippon*), дикие японские кабаны (*Sus scrofa leucomystax*) и японские макаки (*Macaca fuscata*) [11]. Серологические исследования позволили установить, что OZV распространён не только на о. Сикоку, но и в южной и центральной частях о. Хонсю, включая западную часть региона Канто (наиболее урбанизированного, где находится столица Японии – г. Токио). Информация об индикации OZV вне пределов Японского архипелага, в настоящее время, отсутствует.

Информация об индикации OZV вне пределов Японского архипелага, в настоящее время, отсутствует. Отечественным специалистам известны представители рода *Thogotovirus* [1–8, 10] – это вирус Дхори (обнаруженный в Прикаспийской низменности и Закавказье) и вирус Баткен (в Закавказье и Средней Азии). Последний считался самостоятельным видом до 2014 г., но затем был сведён в синонимы к вирусу Дхори.

Оболочечные вирионы OZV имеют плейоморфную форму с характерным размером 80–120 нм. Филаментозные формы могут иметь длину до 250 нм. Геном OZV включает 6 сегментов одноцепочечной РНК негативной полярности от 960 до 2406 п. н. [9]. Белковые продукты сегментов 1–3 (PB2, PB1 и PA, соответственно) представляют собой компоненты полимеразного комплекса. Продукт сегмента 4, гликопротеин GP, является поверхностным гликозилированным белком, участвующим во взаимодействии с рецепторами клетки-мишени. Два сайта N гликозилирования GP OZV (Asn42 и Asn156) аналогичны таковым у вирусов Бурбон и Дхори, а сайт Asn292 – вирусам Бурбон и Тогото. Таким образом, схема N гликозилирования GP OZV в наибольшей степени напоминает схему N гликозилирования GP вируса Бурбон. Продукт сегмента 5, нуклеопротеид NP, взаимодействует с РНК и формирует нуклеопротеид. Продукт сегмента

6, матричный белок М, импрегнирует липидную оболочку вириона изнутри, скрепляя её с нуклеопротеидом.

Для полногеномного секвенирования OZV был разработан набор из 26 пар праймеров с длинами амплифицируемых фрагментов от 228 до 576 п. н. и перекрытиями ампликонов от 79 до 223 п. н. Температура отжига праймеров была подобрана следующим образом: сегмент 1 – $60,1 \pm 0,3$ °C; сегмент 2 – $59,9 \pm 0,3$ °C; сегмент 3 – $59,6 \pm 0,2$ °C; сегмент 4 – $60,1 \pm 0,3$ °C; сегмент 5 – $60,1 \pm 0,2$ °C; сегмент 6 – $60,0 \pm 0,5$ °C. Ввиду того, что некоторые пары праймеров образуют между собой гетеродимеры, рекомендуется брать их избыточное количество.

Список литературы

1. Генетическая характеристика вируса Баткен (BKNV – Batken virus) (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*), изолированного из иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 и комаров *Aedes caspius* Pallas, 1771 и *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 в Средней Азии / С. В. Альховский, Д. К. Львов, М. Ю. Щелканов, А. М. Шетинин, П. Г. Дерябин, Д. Н. Львов, С. С. Львов, Е. И. Самохвалов, А. К. Гительман, А. Г. Ботиков, К. Г. Краснослободцев // *Вопр. вирусологии*. 2014. Т. 59, № 2. С. 33–37.
2. Проблемы безопасности при новых и вновь возникающих инфекциях / Д. К. Львов, А. И. Ковтунов, К. Б. Яшуков, В. Л. Громашевский, А. Ф. Джаркенов, М. Ю. Щелканов, Л. Н. Куликова, Г. Сэвидж, Н. М. Чимидова, Л. Б. Михалева, А. В. Васильев, И. В. Галкина, А. Г. Прилипов, Р. Кинни, Е. И. Самохвалов, Б. Ц. Бушкиева, Д. Гублер, С. В. Альховский, В. А. Аристова, П. Г. Дерябин, А. М. Бутенко, Т. М. Москвина, Д. Н. Львов, Л. В. Злобина, О. В. Ляпина, Г. К. Садыкова, А. Г. Шаталов, В. Е. Усачев, А. Г. Воронина, Лунева Л. И. // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2004. № 5. С. 20–25.
3. Атлас распространения возбудителей природноочаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации / Д. К. Львов, П. Г. Дерябин, В. А. Аристова, А. М. Бутенко, И. В. Галкина, В. Л. Громашевский, А. А. Давыдова, Л. В. Колобухина, С. Д. Львов, М. Ю. Щелканов. М. : Изд-во НПЦ ТМГ МЗ РФ, 2001. 192 с.
4. Таксономический статус вируса Тюлёк (Tyulek – TLKV) (*Orthomyxoviridae*, *Quarantjavirus*, группа Кваранфил), изолированного в Киргизии из клещей *Argas vulgaris* Filippova, 1961 (*Argasidae*) из норových биотопов с гнёздами птиц / Д. К. Львов, С. В. Альховский, М. Ю. Щелканов, А. М. Шетинин, П. Г. Дерябин, В. А. Аристова, А. К. Гительман, Е. И. Самохвалов, Ботиков А. Г. // *Вопросы вирусологии*. 2014. Т. 59, № 2. С. 28–32.
5. *Медицинская вирусология* / ред. Д. К. Львов. М. : МИА, 2008. 656 с.
6. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных* / ред. Д. К. Львов. М. : МИА, 2013. 1200 с.
7. Таксономическая структура *Orthomyxoviridae*: современное состояние и ближайшие перспективы / М. Ю. Щелканов, И. Т. Федякина, Е. С. Прошина, Д. Н. Львов, Р. А. Пономаренко, В. М. Чумаков, Е. И. Бурцева, И. В. Галкина, Д. К. Львов // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2011. № 5. С. 12–19.
8. Изоляция вирусов гриппа А (*Orthomyxoviridae*, Influenza A virus), Дхори (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*) и болезни Ньюкасла (*Paramyxoviridae*, *Avulavirus*) на о. Малый Жемчужный в северо-западной части акватории Каспийского моря / К. Б. Яшуков, М. Ю. Щелканов, С. С. Львов, С. Д. Джамбинов, И. В. Галкина, И. Т. Федякина, Б. Ц. Бушкиева, Т. Н. Морозова, Д. Е. Киреев, Д. С. Аканина, К. Е. Литвин, Е. В. Усачёв, А. Г. Прилипов, Т. В. Гребенникова, В. Л. Громашевский, С. С. Ямникова, А. Д. Забережный, Д. К. Львов // *Вопросы вирусологии*. 2008. Т. 53, № 3. С. 34–38.
9. Characterization of a novel thogotovirus isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks in Ehime, Japan: A significant phylogenetic relationship to Bourbon virus / Н. Ejiri, С. К. Lim,

H. Isawa, R. Fujita, K. Murota, T. Sato, D. Kobayashi, M. Kan, M. Hattori, T. Kimura, Y. Yamaguchi, M. Takayama-Ito, M. Horiya, G. Posadas-Herrera, S. Minami, R. Kuwata, H. Shimoda, K. Maeda, Y. Katayama, T. Mizutani, M. Saijo, K. Kaku, H. Shinomiya, K. Sawabe // *Virus Res.* 2018. Vol. 249. P. 57–65.

10. Zoonotic viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology / D. K. Lvov, M. Yu. Shchelnikov, S. V. Alkhovsky, P. G. Deryabin. Academic Press, 2015. 452 p.

11. Zoonotic Infection with Oz Virus, a Novel Thogotovirus / N. T. B. Tran, H. Shimoda, K. Ishijima, K. Yonemitsu, S. Minami, Y. Supriyono, Kuroda, K. Tatemoto, M. V. Mendoza, R. Kuwata, A. Takano, M. Muto, K. Sawabe, H. Isawa, D. Hayasaka, K. Maeda // *Emerg. Infect. Dis.* 2022. Vol. 28, N 2. P. 436–439.

**БИОРАЗНООБРАЗИЕ
И СИСТЕМАТИКА
ОРГАНИЗМОВ**

УДК 616.9

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ЛАНДШАФТ ВИРУСА SARS-COV-2

А. Н. Бондарюк¹, Ю. С. Букин^{2,3}

*¹Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока, г. Иркутск, Россия*

²Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

*³Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
u. artem. ui@gmail.ru*

Global genomic surveillance of SARS-CoV-2 enables tracking the evolution of the virus in real time. We conducted the retrospective analysis of SARS-CoV-2 evolution from the start of the COVID-19 pandemic in the scope of the evolutionary landscape construct.

Глобальный геномный надзор за новой коронавирусной инфекцией и её возбудителем SARS-CoV-2 в ходе пандемии COVID-19 является беспрецедентным по своим масштабам. На данный момент в открытой базе генетических данных GISAID содержится более 15 млн полногеномных последовательностей SARS-CoV-2. Общий объем получаемой геномной информации позволяет научному сообществу наблюдать эволюцию SARS-CoV-2 в режиме реального времени.

Множественные примеры конвергентной эволюции вируса являются одним из наиболее достоверно установленных следов естественного отбора. Первым геномным маркером с потенциальным селективным преимуществом стала замена аминокислоты (а. к.) D614G в шиповидном белке S, появившаяся в начале 2020 г., и достигшая в глобальной выборке доли, равной 100 %. Секвенирование SARS-CoV-2 в глобальном масштабе позволило подтвердить множественное параллельное возникновение гаплотипа D614G (конвергентная эволюция) в результате давления естественного отбора. Вторая половина 2020 г. отметилась возникновением на разных материках трех вариантов, вызывающих беспокойство (англ. variants of concern, VOCs), обозначенных ВОЗ буквами греческого алфавита: Alpha (Великобритания), Beta (ЮАР) и Gamma (Бразилия). Данные варианты возникли предположительно летом 2020 г. и стали составлять заметную долю в секвенируемых выборках примерно через шесть месяцев в конце 2020 и начале 2021 г. Для всех трёх вариантов было характерно наличие а. к. замены N501Y в рецептор-связывающем домене (RBD) белка S, что также косвенно указывало на селективное преимущество этой мутации. В дальнейшем в ряде серологических экспериментов было установлено, что N501Y позволяет вирусным частицам ускользать от антител, выработанных на дикий тип SARS-CoV-2 из г. Уханя (Китай). Филогенетический анализ показал, что варианты Alpha, Beta и Gamma не являются прямыми потомками друг друга и имеют независимое происхождение, что служит еще одним наглядным примером конвергентной эволюции.

С весны и до конца 2021 г. в мире доминировал вариант Delta, не несущий в себе замены N501Y. Несмотря на то, что сублинии варианта Delta с му-

тацией N501Y встречаются в базе геномных данных GISAID, глобального распространения они не получили. Вариант Delta возник приблизительно в начале 2021 г. в Индии, где вызвал масштабную вспышку заболеваемости. Помимо увеличения сродства (аффинности) с рецептором ACE2 человека и способностью уклоняться от иммунитета варианты Alpha и Delta обладают более оптимизированным относительно друг друга сайтом расщепления двух субъединиц белка S фурином (англ. *furin cleavage site*), что также увеличивает заразность вариантов. Для Alpha и Delta относительная заразность составляет 65 и 55 % соответственно.

В январе 2022 г. происходит закат эры варианта Delta, на смену которому приходит самый заразный из известных вариантов SARS-CoV-2 – вариант Omicron. Сублинии данного варианта доминируют до сих пор. В сентябре 2023 г. доминирующей сублинией Omicron в глобальной выборке по данным сервиса cov-spectrum.org является рекомбинант EG.5.1 (потомок сублинии XBB.1.9.2, классифицированный ВОЗ как вариант, представляющий интерес (англ. *variant of interest, VOI*). Для Omicron характерны относительно высокая заразность, легкое течение болезни и короткий инкубационный период (2,5–2,8 дня для сублинии EG. 5, 3,4–4,0 дней для варианта Delta [1] и две недели для SARS-CoV-2 дикого типа в 2020 г.).

В одной из работ, посвященной анализу эволюционной скорости SARS-CoV-2 [2], с применением байесовского филогенетического вывода исследователи достоверно показали, что повышенной скоростью эволюции обладают непосредственные предковые линии или стебли (англ. *stems*) обозначенных вариантов, внутри же самих вариантов VOCs скорость нуклеотидных замен не превышает «фоновую» скорость замен, т. е. скорость, которой обладают линии дерева, предшествующие стеблям (рис. 1, *a*). Данный факт согласуется с моделью эволюционного ландшафта, согласно которой все варианты а. к. замен в белках можно представить в виде трехмерного рельефа (рис. 1, *b*), при этом участки с повышением и понижением рельефа соответствуют повышению и уменьшению способности белка эффективно выполнять свою функцию и влиять на эффективность размножения (приспособленность) организма или инфекционного агента (мобильные генетические элементы, вирусы, прионы и т. п.). Спуск с возвышенности на таком ландшафте сопоставим с уменьшением приспособленности, а потому крайне мало вероятен.

Варианты VOCs и их сублинии не являются прямыми потомками друг друга. Поэтому каждое появление нового, более заразного и, следовательно, успешного в эволюционном плане варианта обусловлено процессами, происходящими в минорной доле всего генотипического пейзажа SARS-CoV-2. На эволюционном ландшафте доминирующий ранее вариант застревает на вершине своей возвышенности (локальном эволюционном максимуме), в то время как другой, ранее минорный вариант, находит более высокую возвышенность (подходящее сочетание аминокислот) и захватывает доминирующее положение в динамике пандемии.

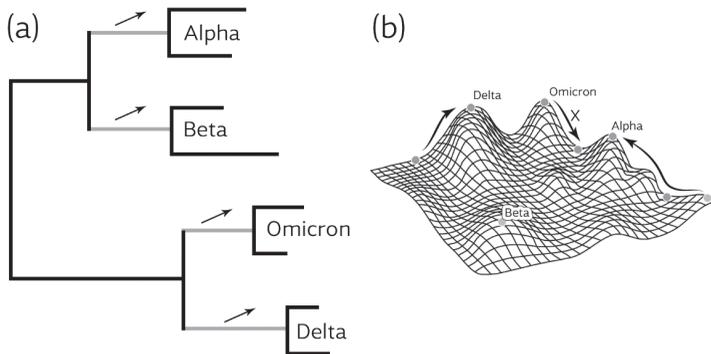


Рис. 1. Увеличение скорости эволюции предковых линий вариантов VOCs вируса SARS-CoV-2 под давлением эпизодического отбора (серый цвет линий) (a); иллюстрация эпизодического отбора на модели эволюционного ландшафта (b)

Более полутора лет, с февраля 2022 по август 2023 г., конкуренция за первенство в эволюционной гонке происходит между сублиниями варианта Omicron, в то время как смена Alpha → Delta и Delta → Omicron, происходила менее чем за год. Вероятно, в эволюционном ландшафте оптимум варианта Omicron является наивысшим, в то время как конкуренция между сублиниями Omicron представляет собой локальное «блуждание» вируса по рельефу данной возвышенности в поисках субоптимума. Исчерпал ли SARS-CoV-2 на варианте Omicron свой основной эволюционный потенциал покажет время.

Список литературы

1. Ogata T., Tanaka H. SARS-CoV-2 Incubation Period during the Omicron BA. 5-Dominant Period in Japan // *Emerg Infect Dis.* 2023. Vol. 29, N 3. P. 595–598
2. The Emergence of SARS-CoV-2 Variants of Concern Is Driven by Acceleration of the Substitution Rate / J. H. Tay [et al.] // *Mol Biol Evol.* 2022. Vol. 39, N 2.

УДК 595.2:595.36

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ *MACROHECTOPUS BRANICKII*

Ж. В. Петунина, Н. В. Ваврищук, Е. В. Романова

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
petuninajmk@mail.ru

Macrohectopus branickii is the only pelagic amphipod from Lake Baikal. In our study we measured and compared 21 quantitative morphological traits in specimens collected from northern basin of the lake. A genetic analysis based on the fragment of the mitochondrial *Nad5* gene performed in the specimens collected in all three basins revealed no specific population structure typical for this species.

Среди разнообразной фауны амфипод оз. Байкал эндемичный вид *M. branickii* (рис. 1, А) является единственным представителем макрозоопланктона и единственным из амфипод, ведущим пелагический образ жизни. Из-за высокой морфологической и экологической специализированности данного вида, его относят к отдельному семейству Macrohectopodidae (Sowinsky, 1915).

Ранее было показано, что этот вид населяет все озеро и встречается на глубинах 100–700 м. [3] *M. branickii* является важным компонентом экосистемы Байкала, так как это главный хищник зоопланктона и важный компонент питания пелагических рыб [5]. Чрезвычайная морфологическая и экологическая дивергенция *Macrohectopus* от его близких генетических родственников и, наоборот, большие генетические дистанции среди других морфологически сходных микроамфиподид позволяют предполагать факт разобщения морфологической и молекулярной эволюции у байкальских амфипод [6].

Митохондриальный геном *M. branickii* является одним из самых длинных среди многоклеточных животных. При этом не ясно, связана ли длина митохондриального генома с образом жизни представителей этого вида. Одним из возможных подходов к изучению такой связи может быть анализ характеристик популяций *M. branickii* в оз. Байкал с использованием митохондриальных белок-кодирующих генов в качестве молекулярных маркеров [7]. До сих пор не смотря на уникальность *M. branickii* не было исследовано его генетическое разнообразие на внутривидовом уровне, а также его внутривидовое морфологическое разнообразие.

Материал для исследования был собран с помощью планктонной сети и трала со всех котловин и берегов оз. Байкал на глубинах 100–300 м в экспедициях 2022 г. (рис. 1, Б). В настоящей работе в качестве молекулярного маркера мы применили фрагмент митохондриального гена *Nad5* длиной около 700 п. о. В дополнение к генетическому анализу проведено измерение 21 морфологического признака по схеме, ранее предложенной в работе Тихоновой [2], для самок *M. branickii*, обитающих в северной котловине оз. Байкал.

По фрагменту митохондриального гена *Nad5* байкальский эндемичный вид ракообразных *M. branickii*, показывает одну панмиктическую популяцию, что согласуется с особенностями его биологии и экологии. Морфологический анализ позволил выявить разную степень variability 21 измеренного признака (рис. 1, В). Уровень фенотипической изменчивости всех морфологических признаков у самок северной котловины не высок (коэффициент вариации составляет 10,82–32,72 %). Наименее вариабельные признаки: общая длина тела; длина 2 и 3 члеников стебелька верхних антенн; ширина и длина проподитов гнатоподов первой пары; ширина проподитов гнатоподов 2 пары; ширина и длина базиподитов переоподов четвертой и пятой пар. Наиболее вариабельные признаки: длина 1 членика стебелька верхних антенн; длина 4 и 5 члеников стебелька нижних антенн; длина проподитов гнатоподов 2 пары; ширина и длина базиподитов переоподов третьей пары; длина стебелька, наружной и внутренней ветвей уроподов третьей пары; ширина и длина тельсона. Признаки с высоким значением вариации показывают высокую валентность вида к условиям среды [4], а также указывают на процессы его микроэволюции [1].

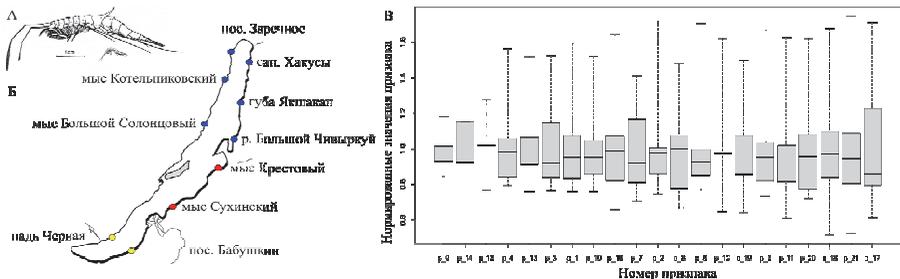


Рис. 1. А – Внешний вид *M. branickii* (сверху вниз – самка и самец). Б – Расположение точек сбора образцов *M. branickii*. Рисунок 1 В. График box-plot variability измеренных морфометрических признаков: r_1 – общая длина тела, r_2–4 – длина первого-третьего членика стебелька верхней антенны, r_5, 6 – длина четвертого-пятого членика стебелька нижней антенны, r_7, 8 – длина проподитов гнатоподов первой-второй пары, r_9, 10 – ширина проподитов гнатоподов первой-второй пары, r_11, 13, 15 – длина базиподитов переоподов третьей-пятой пары, r_12, 14, 16 – ширина базиподитов переоподов третьей-пятой пары, r_17, 18 – длина и ширина тельсона, r_17 – длина стебелька уроподов третьей пары, r_20, 21 – длина наружной и внутренней ветви уроподов третьей пары

Продолжением данного исследования будет секвенирование других генетических маркеров, а также анализ морфологических признаков большего числа особей разного пола, собранных из всех котловин озера.

Список литературы

1. Грант В. Эволюционный процесс. Мир, 1991. Т. 488.
2. Тихонова Е. Н. Эколого-морфологическая изменчивость популяций *Pallasea cancel-lus* (Pallas, 1772) (Crustacea, Amphipoda) в озере Байкал и реке Ангара : дис. ... канд. биол. наук. Улан-Удэ, 2011.

3. Bekman M. Y., Afanasyeva E. L. Distribution and production of *Macrohectopus* // Zn Biological productivity of the Baikal pelagic region and its dynamics. Novosibirsk : Nauka, 1977. P. 76–98.
4. Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns / W. Enard [et al.] // Science. 2002. Vol. 296, N 5566. P. 340–343.
5. New data regarding ecology of freshwater pelagic amphipod *Macrohectopus branickii* (Dybowski, 1874) (Amphipoda: Macrohectopodidae) and other crustaceans of plankton from the southern part of Lake Baikal (Russia, Southern Siberia) / D. Y. Karnaukhov [et al.] // Acta Biologica Sibirica. 2021. Vol. 7. P. 39–48.
6. Macdonald Iii K. S., Yampolsky L., Duffy J. E. Molecular and morphological evolution of the amphipod radiation of Lake Baikal // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2005. Vol. 35, N 2. P. 323–343.
7. The mitochondrial genome of a freshwater pelagic amphipod *Macrohectopus branickii* is among the longest in Metazoa / E. V. Romanova [et al.] // Genes. 2021. Vol. 12, N 12. P. 2030.

УДК 579.253

ТРАНСДУКТАНТЫ ДЖАМБО-ФАГА *SINORHIZOBIVM MELILOTI*

М. К. Горбунова^{1,2}, А. П. Козлова¹, М. Л. Румянцева¹

¹ *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
г. Пушкин, Санкт-Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого,
г. Санкт-Петербург, Россия
gorbunovamk1@gmail.com*

In this work, for the first time using jumbo phage B16.2, transductants of the phage-sensitive strain *Sinorhizobium meliloti* Md3/4 were obtained and characterized, which possessed a wide spectrum of resistance to geographically different soil phages, had different structural changes in their genomes, and differed among themselves in the rate of nodule formation on the roots of the host-plant.

Фаги клубеньковых бактерий преимущественно имеют размер от 60 до 250 нм [2], но недавно были описаны ризобифаги, имеющие размер вириона до 0,45 мкм, а размер генома более 200 т. п. н. Такие фаги относят к отдельной группе джамбо-фаги, которые имеют собственный транскрипционный аппарат, а также последовательности, кодирующие белки иммунной системы. Доля изученных геномов джамбо-фагов составляет менее 3 % от числа изученных фагов представителей порядка *Caudoviricetes* [3]. Нами впервые выявлен и изучен джамбо-фаг B16.2, размер генома которого составил более 470 т. п. н. [1] Данный фаг показал высокую литическую активность в отношении штаммов клубеньковых бактерий люцерны (*Sinorhizobium meliloti*) из различных популяций, что обусловило наш интерес в получении и изучении трансдуктантов джамбо фага B16.2.

В результате было получено десять спонтанных трансдуктантов фагочувствительного штамма *S. meliloti* Md3/4 с использованием джамбо-фага B16.2. Анализ фагоустойчивости трансдуктантов проводили методом двуслойного агар по Адамсу, а также с использованием спот-теста. Была проведена оценка фагоустойчивости трансдуктантов по отношению к 12 почвенным фагам из коллекции лаборатории, что позволило выявить существенные различия между трансдуктантами по фагоустойчивости. Три трансдуктанта B16.2, устойчивые ко всем изученным почвенным бактериофагам и имевшие изменения зон лизиса по сравнению с исходным родительским штаммом, были отобраны для дальнейшего анализа. Была выделена ДНК из указанных трансдуктантов и проведен ее анализ с использованием ERIC и REP ПЦП-праймеров. В результате были получены данные, позволяющие сделать вывод, что в трансдуктантах произошли разные геномные перестройки.

Была проведена оценка симбиотической активности трансдуктантов в симбиозе с люцерной в условиях стерильных микровегетационных опытов. Оценку проводили по скорости образования клубеньков на корнях растений. Один из трех трансдуктантов формировал клубеньки на 6-й день после инокуляции,

также, как исходный штамм и штамм-референт, тогда как два других трансдуктанта формировали клубеньки в среднем на три дня позже. На 22-й день после инокуляции первый из указанных трансдуктантов сформировал клубеньков на 67,8 % больше, чем родительский штамм, тогда как оставшиеся два трансдуктанта, наоборот, формировали в среднем клубеньков на 10 % меньше.

Таким образом, впервые с использованием джамбо-фага Б16.2 получены и охарактеризованы трансдуктанты фагочувствительного штамма *S. meliloti* Md3/4, которые обладали широким спектром устойчивости к географически различным почвенным фагам, имели различные структурные изменения в их геномах и различались между собой по скорости формирования клубеньков на корнях растения-хозяина.

Работа выполнена при поддержке НЦМУ «Агротехнологии будущего» № 075-15-2022-320 от 20.04.2022.

Список литературы

1. Козлова А. П., Мунтян В. С., Румянцева М. Л. Джамбо-фаг *Sinorhizobium meliloti* // Высокопроизводительное секвенирование в геномике (HSG-2022) : сб. тез. III Всерос. конф. Новосибирск, 19–24 июня 2022 г. Новосибирск : Академиздат, 2022. С. 52.
2. Diversity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* Bacteriophages in the Rhizosphere of *Medicago marina*: Myoviruses, Filamentous and N4-Like Podovirus / M. T. Cubo, C. Alfás-Villegas, E. Balsanelli, D. Mesa, E. De Souza, M. R. Espuny // Front. Microbiol. 2020. Vol.11.P. 1–14.
3. Weinheimer A. R. Aylward F. O. Infection strategy and biogeography distinguish cosmopolitan groups of marine jumbo bacteriophages // The ISME Journal. 2022. Vol. 16. P. 1657–1667.

УДК 593.17:575.86:57.063.4

DIVERSITY, PHYLOGENY AND SYSTEMATICS OF CILIATE SUBCLASS CHONOTRICHIA

I. V. Dovgal¹, J. Fahrni² and Zhishuai Qu^{3,4}

¹*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Sevastopol, Russian Federation*

²*Vy-Creuse 37, CH-1196 Gland, Switzerland*

³*State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, China*

⁴*Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystem,
The Fujian Provincial Key Laboratory for Coastal Ecology and Environmental Studies,
College of the Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen, China*

dovgal-1954@mail.ru

Chonotrichia is a compact ciliate taxon, numbers 112 species mainly inhabiting marine and freshwater crustaceans. The comparative analysis of morphology (with emphasis to apical funnel), development, and SSU rDNA sequences in representatives of subclass has demonstrated that Chonotrichia is monophyletic group that sister to the Dysteriida, the genus *Chilodochona* is a basal taxon regards to other chonotrichs, which supports the separation of order Chilodochonida, and that chonotrichs with endogemmite budding are derived from exogemmids.

Subclass Chonotrichia belongs to Class Phyllopharyngea and the Subphylum Intramacronucleata [6]. Chonotrichs are solitary, non-colonial sessile ciliates. 112 of chonotrich species are known to date, which are epibionts (with one exception – *Eleutherochona sivertseni* inhabits on the red alga *Epymenia* sp.) on representatives of different taxa of marine and freshwater crustaceans [2–5]. Chonotrichia is widely distributed taxon, but 5 species of genus *Spirochona* and 16 species of *Cavichona* are possible endemics of lake Baikal [4].

The mode of asexual reproduction is important for the taxonomy of chonotrichs. In particular the subclass Chonotrichia is subdivided into two orders Exogemmida and Cryptogemmida on the basis of this character. The presence of preoral apical funnel is the most characteristic feature of chonotrichs. It is believed that the complication of apical funnel structure reflects the main evolutionary trends within the orders of Chonotrichia [4].

It is Jankowski's [4] opinion that some stages of chonotrich swarmer development (named him as stage of Phialochona, and *Lobochona*-like stages) reflect some hypothetical steps of taxon evolution.

The chonotrich taxonomy was established in the milestone book of Jankowski [4] who described eight families, 33 genera and 83 species. Jankowski [4] has summarized the concept of phylogenetic relations in Chonotrichia mainly based on the modes of asexual reproduction, the morphology of some stages in swarmer development and the morphology of apical funnel.

Furthermore, Jankowski [4] has discussed two general evolutionary lines within Chonotrichia that correspond to forms with exogemmy and cryptogemmy. Hence, the subclass Chonotrichia was subdivided into two orders Exogemmida and Cryptogemmida.

togemmida on the basis of mode of asexual reproduction. However, the order Chilodochonida Batisse, 1994 was recognized by Batisse [1] based on special morphology of preoral structures in their representatives. Fahrni et al. [3] accepted the assignment of order Chilodochonida based on their analysis of SSU rDNA sequences in four chonotrich species and literary data but proposition of the order Chilodochonida for part of the exogemmids raises the question of the name of the order Exogemmida, which should be changed or retained. If the Exogemmida are retained, then it should be divided into two suborders, Chilodochonina (an alternative of the order Chilodochonida) and Lobochochonina, according to the pattern of the perioral ciliature [5].

By this means there are some key positions in phylogeny of Chonotrichia, which might be checked using molecular approaches. 1. What ciliate taxon is most relative to possible ancestor of Chonotrichia? 2. What taxon of Chonotrichia have most primitive morphology of apical funnel and correspondingly fills the basal position at the tree of the subclass? 3. Are cryptogemmid chonotrichs derived from exogemmids and is Isochonidae the most primitive family of order Cryptogemmida?

The representatives all three orders of the subclass Chonotrichia were investigated. The comparative data on Chonotrichia and on outgroups (Suctorea and the Oligohymenophorea) were obtained from GenBank.

The obtained phylogenetic tree with outgroups testifies [3] that Chonotrichia is monophyletic group sister to the Dysteriida. The dysteriid closest to the chonotrichs is *Hartmannula sinica*, which probably approaches to the supposed ancestors of the Chonotrichia.

Thus, our data in outline consistent with the evolutionary trends in Chonotrichia formulated on the basis of the comparative morphology of trophonts and swarmer of these ciliates. The obtained results might be summarized in follows conclusions:

- Chonotrichia is monophyletic group that sister to the Dysteriida.
- The dysteriids closest to the Chonotrichia are representatives of Hartmannulidae rather than Dysteriidae.
- The genus *Chilodochona* occupy a basal position regard other chonotrichs, the chilodochonid sequences are clearly outside of the order Exogemmida that supports the separation of order Chilodochonida.
- The separation Exogemmida/Cryptogemmida, based on the two different budding modes, is supported with the molecular data existing actually.
- The Cryptogemmida derived from Exogemmida, whereas Isochonidae is the basal group for Cryptogemmida.
- Molecular data from several other chonotrich families are clearly needed for obtaining more detailed tree.

References

1. Batisse A. Sous-classe des Chonotrichia Wallengren, 1895. *Grassé P. -P. (ed.) Traité de Zoologie*. Paris, Masson, 1994, 2, pp. 433–473.
2. Fahrni J., Dovgal I. V. Towards the tree of subclass Chonotrichia (Ciliophora). *Study of aquatic and terrestrial ecosystems: History and contemporary state*. Book of abstracts of the International scientific conference dedicated to the 150th anniversary of the Sevastopol Biological Sta-

tion – A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas and to the 45th anniversary of research vessel “Professor Vodyanitsky”. Sevastopol, IBSS RAS Publ., 2021. p. 498.

3. Fahrni J., Dovgal I.V., Zhishuai Qu. Molecular phylogeny of Chonotrichia (Ciliophora, Phyllopharyngea) inferred from SSU rDNA sequences. *European Journal of Protistology*, 2022, vol. 86, art. no. 125920, pp. 1–8.

4. Jankowski A.W. *Fauna of the USSR. Infusoria Subclass Chonotricha*. Vol. 2, No. 1. Leningrad, Academy of Science SSSR Publ., 1973, 355 p.

5. Jankowski A.W. Phylum Ciliophora Doflein 1901. *Alimov A. F. (ed.), Protista: Handbook on Zoology*. St. Petersburg, Nauka Publ., 2007, part 2., pp. 415–976.

6. Lynn D.H. *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature*. 3rd ed. Berlin, Dordrecht, Springer, 2008, 605 p.

УДК 575.858

ВИДООБРАЗОВАНИЕ У БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК LUBOMIRSKIIDAE – НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ГЕНОМНЫЕ МАРКЕРЫ

В. Б. Ицкович, А. А. Афанасьева, О. Ю. Глызина

*Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
itskovich@mail.ru*

The investigations of 28S rDNA of 16 species of families Spongillidae and Lubomirskiidae was performed. Our results revealed that the 28S rDNA has been shown to be useful for family and species-level identification of freshwater sponges within the Spongillida.

Губки (Porifera, Spongillida) составляют основную часть биомассы бентоса в оз. Байкал и представлены семейством Lubomirskiidae, букетом эндемичных видов, и несколькими видами космополитного семейства Spongillidae. Целью работы является определение границ 14 описанных на сегодня видов и подвидов любомирскийид, и выявление новых криптических видов.

Ранее было показано, что спейсеры ITS1 и ITS2 рДНК являются единственными хорошо функционирующими маркерами для видовой идентификации Spongillidae, однако обсуждались проблемы выравнивания и влияние внутривидовой изменчивости. Более того, ITS спейсеры пресноводных губок не показали хорошего разрешения на уровне выше уровня рода. Поэтому актуален поиск дополнительных молекулярных маркеров для анализа филогении пресноводных губок.

Мы впервые провели анализ фрагмента 28S рДНК 16 видов пресноводных губок, и показали перспективность этого маркера для анализа филогении и видовой идентификации. Пробы губок были собраны в трех точках сбора в Центральном Байкале: пролив Малое море, пос. Курма, пролив Малое море, пос. Зама, мыс Ижимей на острове Ольхон во время экспедиции, выполненной в 2022 г. Для всех образцов получены изображения *in vivo*. Образцы губок сразу после сбора использовали для выделения ДНК и фиксировали в 70%-ном этаноле для морфологического исследования. Некоторые образцы были сохранены живыми и помещены в аквариумы экспериментального пресноводного аквариумного комплекса байкальских гидробионтов ЛИИ СО РАН для дальнейшего молекулярного анализа. Видовая идентификация особей проводилась на основе морфологического анализа скелета и спикул.

Фрагмент примерно из 340 нуклеотидов, соответствующий D3 домену 28S рДНК губки, был получен для 31 образца Lubomirskiidae и 6 образцов Spongillidae. Анализ BLAST показал, что полученные последовательности были сходны с несколькими видами Spongillidae. Все последовательности Spongillidae, отнесенные морфологически и с помощью молекулярного анализа к разным видам, имели нуклеотидные замены. Уровень внутривидовой изменчивости проанализированного фрагмента 28S рДНК составлял 0,3–0,7 % для *Ephydatia fluviatilis* и 0,7–1,4 % для клады *Eunapius*.

Филогенетические деревья показали, что последовательности образцов *Ephydatia muelleri* (7 последовательностей), *Spongilla lacustris* (5 последовательностей), *Eunapius fragillis* (4 последовательности) образуют монофилетические клады. Некоторые клады имеют низкие апостериорные вероятности и бутстреп-поддержки; однако все проанализированные виды Spongillidae различаются по этому фрагменту гена нуклеотидными заменами и делециями-вставками. Примечательно, что в анализ были включены образцы каждого вида из географически удаленных районов. Обращает на себя внимание и факт большей генетической дивергенции *Trochospongilla horida*, что также подтверждается анализом других генетических маркеров. Следовательно, анализ последовательностей и филогенетический анализ определили 28S рДНК как подходящий баркодинг маркер для Spongillidae. Преимущество коротких последовательностей показано при анализе старых музейных голотипов. При длительном хранении ДНК частично разрушается, и длинные фрагменты не могут быть амплифицированы и секвенированы. Так, возможность амплификации коротких фрагментов (100 п. н.) оказалась полезной для анализа образцов возрастом более 100 лет. Мы предполагаем, что фрагменты 28S рДНК могут быть использованы с той же целью, когда будет накоплена достаточная база последовательностей разных видов. Также возможно, что использование более длинного фрагмента 28S рДНК, такого как D3-D5 домены, повысит его разрешение для близкородственных видов губок.

На филогенетическом дереве, основанном на 28S рДНК, байкальские губки Lubomirskiidae монофилетичны. Это соответствует ранее полученным результатам и подтверждает единичную интродукцию этого эндемичного семейства в оз. Байкал. Разграничение видов внутри Lubomirskiidae затруднено из-за высокой морфологической изменчивости байкальских губок. Наличие замен во фрагменте 28S рДНК в нескольких образцах указывает на генетическую дивергенцию и возможность существования новых неописанных видов [1]. Два из трех дивергентных экземпляров имели морфологию, сходную с уже описанными видами Lubomirskiidae. Отсутствие морфологических различий при наличии генетической дивергенции ранее отмечалось для глубоководных губок оз. Байкал и может быть признаком криптического видообразования. Предварительная идентификация этих образцов на основе недорогого анализа коротких последовательностей является необходимым шагом перед получением геномных данных.

Массовое заболевание, поразившее в последнее время различные виды байкальских губок, усиливает важность уточнения их таксономии для оценки и сохранения биоразнообразия. На сегодняшний день только анализ геномных и транскриптомных данных позволили разрешить филогению на уровне родов внутри Lubomirskiidae [2; 3]. Образцы 4 видов Lubomirskiidae, в том числе генетически дивергентные по фрагменту 28S рДНК были отобраны для проведения ddRAD-анализа. Также в анализ были взяты неидентифицируемые согласно морфологии образцы с промежуточными морфологическими характеристиками. Анализ данных полногеномного генотипирования полученных методом

ddRAD секвенирования показал перспективность использования данного подхода для определения границ видов Любомирскиид.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01037, <https://rscf.ru/project/22-24-01037/>.

Список литературы

1. Itskovich V., Kaluzhnaya O., Glyzina O. The utility of 28S rDNA for barcoding of freshwater Sponges (Porifera, Spongillida) // Diversity. 2022. Vol. 14. P. 1126–2480.
2. Symbiosis, selection, and novelty: freshwater adaptation in the unique sponges of Lake Baikal / N. J. Kenny, B. Plese, A. Riesgo, V. B. Itskovich // Molecular Biology and Evolution. 2019. Vol. 36, N 11. P. 2462.
3. Kenny N. J., Itskovich V. B. Phylogenomic inference of the interrelationships of Lake Baikal sponges // Systematics and Biodiversity. 2021. Vol. 19, N 2. P. 209–217.

УДК 579.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ДЕЛИМИТАЦИИ ВИДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТАКСОНОМИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ, ИССЛЕДОВАННЫХ НА ОСНОВЕ МЕТАБАРКОДА ПО ФРАГМЕНТУ ГЕНА 16S РРНК

П. М. Колесников^{1,2}, А. В. Ломакина², О. В. Шубинкова², Ю. С. Букин^{1,2}

¹*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия*

²*Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
awenxolf@gmail.com*

The paper proposes a pipeline for analyzing the results of metabarcoding of a community of prokaryotic organisms based on 16s rRNA. The analysis of data in the pipeline is supplemented by the use of delimitation methods, which allows to increase the efficiency of data processing.

Метабаркодинг на основе фрагмента гена 16S rRNA является популярным средством для анализа таксономического состава и функциональных характеристик прокариотических организмов. Наиболее популярной технологией получения первичных данных является IlluminaMiSeq, которая позволяет читать фрагменты длиной до 450 п. н. Наиболее современным методом анализ таких данных предполагает выделение уникальных генотипов (ASV – amplicon sequence variante), характеризующих представленность в образце клонов какого-либо из штаммов микроорганизмов (МО). Для более детального анализа необходимо объединить ASV в группы, характеризующие представленность не штаммов, а видов МО. Обычно это осуществляется с помощью таксономической идентификации ASV по базам данных 16S rRNA. В геносистематике получили развитие ряд методов, которые без предварительной таксономической идентификации по базам данных позволяют выделить кластеры последовательностей видового уровня – методы молекулярной делимитации видов. К таким методам относятся:

Poisson tree processes (PTP, процессы дерева Пуассона) [1] – модель разграничения видов на укорененном филогенетическом дереве. В PTP моделируется видообразование или события ветвления с точки зрения количества замен в нуклеотидных последовательностях.

Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP, выделение видов с помощью автоматического разделения) [5] – метод основан на построении кластеров видового уровня на основе выравнивания последовательностей 1 локуса. ASAP позволяет обрабатывать данные большого размера (до 10 тыс. особей/генотипов).

Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC, обобщенный смешанный коалесцентный метод Йюля) [4] – вероятностный метод разграничения видов путем оптимизации внутривидовых (популяционных) и межвидовых моделей ветвления к реконструированному генным деревьям.

Целью нашего исследования является адаптация методов молекулярной делимитации видов (PTP, ASAP, GMYC) для группировки ASV в кластеры по-

следовательностей ампликонов 16s рРНК видового уровня. Для реализации цели исследования был разработан конвейер анализа данных (рис 1.), объединяющий алгоритм выделения ASV – dada2 [2; 3] с методами молекулярной делимитации видов.



Рис. 1. Схема конвейера

Тестирование конвейера было проведено на результатах анализа сообществ прокариот (бактерии, археи) донных осадков в районе Северного Байкала в местах с глубин 900–925 м, содержащих железомарганцевые корки и высокие концентрации метана (CH₄). Применение конвейера позволило оптимизировать структуру массива данных для дальнейшего анализа методами вычислительной экологии.

Список литературы

1. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements / Zhang J. [et al.] // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, N 22. P. 2869–2876.
2. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, N 15. P. 2114–2120.
3. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. J. Callahan [et al.] // *Nature methods*. 2016. Vol. 13, N 7. P. 581–583.
4. Fujisawa T., Barraclough T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets // *Systematic biology*. 2013. Vol. 62, N 5. P. 707–724.
5. Puillandre N., Brouillet S., Achaz G. ASAP: assemble species by automatic partitioning // *Molecular Ecology Resources*. 2021. Vol. 21, N 2. P. 609–620.

УДК 577.2

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПО ОБРАЗЦАМ МЯГКИХ ТКАНЕЙ, ПОДВЕРГШИХСЯ РАЗРУШЕНИЮ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

А. В. Ляпунов, В. М. Корзун, А. В. Холин, К. В. Лопатовская

*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Иркутск, Россия
liapunov.asp@mail.ru*

The study presents the results of taxonomic identification of mammals by molecular genetic methods. Fragments of dried soft tissues of animals found in their natural habitat in the republics of Altai and Tyva have been studied.

В работе представлены результаты таксономической идентификации млекопитающих молекулярно-генетическими методами при исследовании фрагментов высохших мягких тканей, собранных в естественной среде обитания с останков животных. Взятые для изучения образцы тканей имели различную степень деградации в результате действия физических (солнце, осадки и т. д.) и биологических (микрорганизмы, насекомые-трупоеды, наземные и пернатые хищники) факторов.

Материалы и методы. Исследованы объекты, собранные в 2022–2023 гг. на трансграничных с Монголией территориях Республик Алтай и Тыва. Изученные образцы – это останки грызунов, найденные в местах их обитания, и фрагменты мелких млекопитающих, обнаруженные в гнездах хищных птиц. Кроме этого, в анализ взяты ткани с трупов копытных и хищников. Также в работе использованы два образца, подвергавшиеся длительной термической обработке: сухожилие с таранной кости домашней овцы из традиционного монгольского супа и фрагмент соединительной ткани из холодца, приобретённого на Центральном рынке г. Иркутска, приготовленного из «дикого мяса».

Для генетической идентификации использовали три пары праймеров: к фрагменту D-петли – СВТ (CCGCCATCAACACCCAAAGCTG) и MR1 (CCCTGAAGTAAGAACCAGATGCCTG), к фрагменту гена цитохрома b – L14115 (CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG) и L14532 (GCAGCCSSTCAGAATGATATTTGTCCAC), к фрагменту гена большой субъединицы рибосомальной РНК митохондрий – LR-J-13007 (TTACGCTGTTATCCCTAA) и LR-N-13398 (CGCCTGTTTATCAAAAACAT).

Выделение ДНК проведено с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (торговая марка АмплиСенс®). Температурный профиль реакции: начальная денатурация – 15 с при 98 °С; 35 циклов – 94 °С, 30 с, 52 °С – 20 с, 72 °С – 1 мин; финальная элонгация – 72°С, 4 мин. Объем реакционной смеси – 25 мкл. Продукты амплификации визуализированы с помо-

щью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с применением EtBr. Для очистки продуктов ПЦР использован набор ExoSAP-IT, Thermo FS. Первичные последовательности ДНК получены на приборе Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzers (Beckman Coulter, США). Нуклеотидные последовательности выравняли в программе BioEdit.

В результате проведённых исследований, удалось идентифицировать большинство взятых в работу образцов. Полученные последовательности депонированы в GenBank.

При отработке методики исследован материал, подвергавшийся термическому воздействию. В одном случае это был фрагмент сухожилия с таранной кости овцы *Ovis arie*, использованной в августе 2022 г. для приготовления монгольского супа. До начала анализа кость находилась пять месяцев в высушенном состоянии при комнатной температуре. Из образца была успешно выделена ДНК и прочитан фрагмент D-петли длиной 707 п. н. (OQ139533). При сравнении с последовательностями в GenBank установлено, что она наиболее близка с образцами, полученными от овец, разводимых на Тибете. Во втором случае использован фрагмент соединительной ткани из холодца, приобретённого на рынке и приготовленного из «дикого» мяса копытного животного, добытого в Иркутской области. Анализ полученных последовательностей (OQ784845, OQ740166) показал, что объект действительно принадлежал благородному оленю *Cervus elaphus* подвида – *xanthopygus* (изюбр, восточноазиатский настоящий олень).

Были исследованы четыре образца, полученные из останков сурков (*Marmota*): высохшие мягкие ткани трех хвостов, обнаруженных на стоянках животноводов в Кош-Агачском районе Республики Алтай и соскоб с нижней челюсти, найденной в Баян-Улгийском аймаке Монголии. Видовую принадлежность удалось установить для двух проб из хвостов, найденных в 2022 г. на стоянке в долине р. Ирбисту (OQ784844, OQ740162) и в 2023 г. в долине р. Бар-Бургазы (OR234319), оба объекта принадлежат виду *M. baibacina*. Образец, полученный от третьего хвоста, был контаминирован генетическим материалом домашней лошади (*Equus caballus*), а соскоб с челюсти, биоматериалом домашней козы (*Capra hircus*) в количестве достаточном для выделения ДНК в том объеме, чтобы прочесть фрагмент гена цитохрома b длиной 357 п. н., принадлежащего данному виду (OR291145).

Фрагменты хвостов мелких млекопитающих, найденные в урочище Бора-Шай (Овюрский кожуун, Республика Тыва) в жилом гнезде черного грифа, принадлежали длиннохвостому суслику *Urocitellus undulatus* (OR371611, OR367311) и узкочерепной полевке *Lasiopodomys gregalis* (OR367312, OR371612).

В мае 2022 г. на границе Республики Алтай и Монголии вблизи села Ташанта был найден череп хищника с сохранившимся на кончике носа небольшим участком кожи, из которого были выделены нуклеиновые кислоты. Установлено, что данный объект принадлежит степной лисице *Vulpes corsac* (OQ139532, OQ550481).

В мае 2023 г. на территории Сайлюгемского национального парка (Республика Алтай) обнаружены останки трёх особей горного барана, вида, занесенного в Красную Книгу. В двух случаях это были высохшие головы взрослых самцов, по всей видимости добытые в результате незаконной охоты. Одна голова обнаружена на берегу р. Ташантинка вблизи с. Ташанта (OR237188), а другая в урочище Большой Кочкор-Бас (OR237187, OR230036). В низовье р. Уландрыка найден полный скелет погибшего животного (OR237186,). Для исследования использовали различные фрагменты останков: кожа, мышечные волокна и сухожилие соответственно. В результате анализа подтверждено, что все животные принадлежали к виду архар – *Ovis ammon* или аргали, как его называют в данной местности.

Использованный подход позволяет определить таксономическую принадлежность найденных останков животных, когда отсутствуют ключевые морфологические диагностические признаки, в результате деятельности хищников. При этом видовая идентификация может быть успешной и в тех случаях, когда объекты подвергались воздействию внешних неблагоприятных для сохранения нуклеиновых кислот факторов. Также применение молекулярно-генетических методов поможет установить видовую принадлежность охраняемых животных, добытых браконьерами.

УДК 575.8

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОД РОДА *OMMATOGAMMARUS* НА РАЗНЫХ ГЛУБИНАХ ОЗЕРА В РАЙОНЕ ПОСЕЛКА БОЛЬШИЕ КОТЫ

Е. В. Мадьярова¹, А. А. Дягилева¹, П. Б. Дроздова^{1,2} М. А. Тимофеев^{1,2}

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²Байкальский исследовательский центр, г. Иркутск, Россия
madyarova@gmail.com

The aim of the study was to determine phylogenetic relationship and time of divergence from the last common ancestor of amphipods of the genus *Ommatogammarus* Stebbing, 1899.

Байкальские амфиподы (Amphipoda, Crustacea) представляют собой уникальную модельную систему для изучения вопросов эволюции и адаптации. В Байкале обитает более чем 350 эндемичных видов и подвидов амфипод, которые населяют почти все зоны и глубины озера и характеризуются широчайшим разнообразием адаптивных способностей. Особый интерес представляет уникальная пресноводная глубоководная фауна, которая является единственной в мире.

Род *Ommatogammarus* Stebbing, 1899 относится к глубоководным пресноводным амфиподам оз. Байкал и представлен четырьмя видами и двумя подвидами: *O. albinus* (Dyb., 1874), *O. flavus* (Dyb., 1874), *O. carneolus melanophthalmus* Dor. in: Bazikalova, 1945, *O. carneolus carneolus* (Dyb., 1874), *O. carneolus amethystinus* (Dyb., 1874) и *O. hyacinthinus* (Dyb., 1974). На данный момент известно только то, что *O. albinus*, и *O. flavus* генетически два разных вида; для подвидов *O. carneolus* есть только морфологическое описание с указанием, что ключевые морфологические отличия между представителями являются нестойкими. Также известно (по нашим наблюдениям), что для *O. albinus*, и *O. flavus* существуют разные цветовые морфы на разных глубинах. Поэтому целью исследования было определение генетического родства внутри рода *Ommatogammarus*, определения возраста этой группы видов и определение популяционно-генетической структуры некоторых представителей рода в пределах одной локации, но на разных глубинах. Сбор амфипод осуществляли в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал) со льда озера с помощью глубоководных донных ловушек в марте 2021, 2022 и 2023 гг. Отбор проводили на глубинах от 50 м до 1000 м. В ходе работы удалось отловить все исследуемые виды и подвиды, кроме *O. hyacinthinus*. Животных фиксировали в спирте и жидком азоте. В качестве маркерных генов был выбран участок гена мтДНК первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (COI) и ядерной 18S рРНК. Оценка возраста общего предка проводилась в программе BEAST2 с использованием известного для амфипод значения скорости накопления мутаций (1,773 % за миллион лет) в гене COI.

На рис. 1 представлена сеть гаплотипов участка гена COI *Ommatogammarus*. Видно, что представители рода *Ommatogammarus* разделились на четыре

кластера: *O. albinus*, *O. flavus*, *O. carneolus melanophthalmus*, а *O. carneolus carneolus* и *O. carneolus amethystinus* на древе образовали единый кластер. Расстояние между видами составило 80 ± 10 пар оснований / 662 пар оснований, и оно соответствует расстоянию между отдельными видами.

Гаплотипическое разнообразие кластера *O. carneolus carneolus* и *O. carneolus amethystinus* по сравнению с другими представителями рода крайне высокое: насчитывается как минимум 20 гаплотипов. Напротив, гаплотипическое разнообразие внутри *O. albinus* и *O. flavus* крайне низко. Так мы получили нуклеотидные последовательности представителей этих двух видов с разных глубин (50 м, 100 м, 200 м, 600 м, 700 м и 1000 м) и обнаружили, что они практически идентичны. Таким образом, существование морфологически описанных *O. carneolus carneolus* и *O. carneolus amethystinus* не подтвердилось. По оценкам общий предок рода *Ommatogammarus* существовал более 4,5 млн л. н. Разделение *O. flavus* и *O. carneolus melanophthalmus* произошло около 4,2 млн л. н., а *O. carneolus melanophthalmus* и *O. carneolus carneolus* и *O. carneolus amethystinus* – 3 млн л. н.

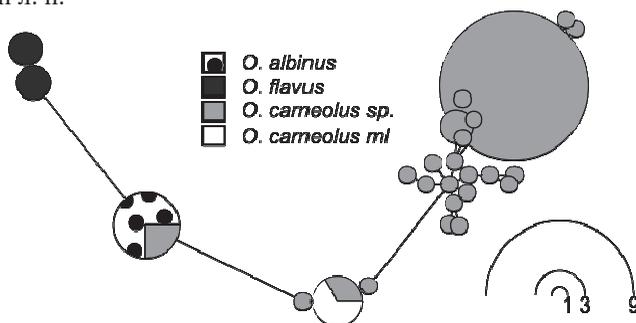


Рис. 1. Сеть гаплотипов участка гена COI *Ommatogammarus* реализованная в среде R с пакетом программ PEGAS (Population and Evolutionary Genetics Analysis System), построенная методом максимальной парсимони

Анализ сети гаплотипов, построенной на основании участка гена 18S рРНК, подтвердил существование видов *O. albinus* и *O. flavus*, однако не выявил какой-либо подразделенности на отдельные подвиды в пределах *O. carneolus*, что может указывать на то, что это один вид.

Таким образом, все исследованные в данной работе виды принадлежат к роду *Ommatogammarus*. Как по ядерному, так и митохондриальному маркеру мы выделяем существование *O. albinus* и *O. flavus*. *O. carneolus*, скорее всего, разделен на две генетических линии, *O. carneolus melanophthalmus* и объединенные *O. carneolus carneolus* и *O. carneolus amethystinus*, поскольку мы обнаружили разделение по митохондриальному маркеру, но не обнаружили разделения по ядерному.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00128, <https://rscf.ru/project/22-14-00128/>.

УДК 575.852

КЛЕТОЧНАЯ Т-ДНК В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ РАСТЕНИЙ

Т. В. Матвеева

*Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург, Россия
radishlet@gmail.com*

Агробактериальная трансформация широко используется людьми для получения трансгенных растений для нужд сельского хозяйства, медицины, ветеринарии. Однако известны случаи, когда аналогичные процессы происходят в природе: агробактерия трансформирует клетки растения, из трансгенных клеток регенерируют целые организмы, несущие в геноме ее Т-ДНК (transferred DNA, переносимая ДНК) и передающие ее в ряду половых поколений сотни тысяч или даже миллионы лет. Такая Т-ДНК получила название клеточной (клТ-ДНК), а ее обладателей называют природными ГМО.

клТ-ДНК могут быть использованы в филогенетических исследованиях, поскольку каждое трансформационное событие маркирует монофилетическую группу таксонов. Далее горизонтально перенесенные фрагменты ДНК накапливают мутации, анализ разнообразия которых позволяет реконструировать более тонкие филогенетические отношения исследуемых видов или родов, а также изучать внутривидовую изменчивость.

Изложенный выше подход был использован нами в филогенетических исследованиях родов *Linaria* Mill. [1], *Nicotiana* L. [2], *Camellia* L. [3], *Vaccinium* L. [4], что будет подробно рассмотрено в докладе.

Молекулярные маркеры на основе клТ-ДНК удобны в использовании, производительны, информативны.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-322 от 22.04.2022 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Список литературы

1. Matveeva T. V. Agrobacterium-mediated transformation in the evolution of plants // Curr. Top. Microbiol. Immun. 2018. Vol. 418. P. 421–441.
2. Хафизова Г. В., Матвеева Т. В. Полиморфизм последовательностей ДНК агробактериального происхождения в сортах *Nicotiana tabacum* // Генетика. 2020. Т. 56, № 10. С. 1215–1217.
3. Conservation of an Agrobacterium cT-DNA insert in *Camellia* section *Thea* reveals the ancient origin of tea plants from a genetically modified ancestor / K. Chen, P. Zhurbenko, L. Danilov, T. Matveeva, L. Otten // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13. Art. 997762.
4. Biodiversity of roIB/C-like Natural Transgene in the Genus *Vaccinium* L. and Its Application for Phylogenetic Studies / R. Zhidkin, P. Zhurbenko, O. Bogomaz, E. Gorodilova, I. Katsapov, D. Antropov, T. Matveeva // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24, N 8. Art. 6932.

УДК 575.174.015.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРЕСНОВОДНОЙ ПЕННАТНОЙ ВОДОРОСЛИ *ULNARIA ACUS* (KÜTZING) AVOAL ЕВРАЗИИ

М. А. Налимова, А. М. Марченков, Ю. Р. Захарова, Д. П. Петрова

*Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
nalimov.maria@yandex.ru*

Ulnaria acus is a cosmopolitan freshwater diatom. In this work, we analyzed 23 strains of this species isolated from different freshwater ecosystems of Eurasia. The obtained results suggest that the analysis of the marker gene *cox1* makes it possible to divide *U. acus* into separate genotypes.

Диатомовые водоросли (Bacillariophyta) – одноклеточные автотрофные эукариотические организмы, доминирующие в составе фитопланктона водоемов различного типа, а также встречающиеся во влажных наземных биотопах. Популяции диатомовых водорослей являются генетически неоднородными и представляют собой сочетание разных генотипов.

Предполагается, что генетическая гетерогенность поддерживается за счет полового процесса и необходима для более эффективной адаптации к изменениям окружающей среды. В настоящее время внутривидовая изменчивость пресноводных пеннатных диатомей изучена недостаточно.

В качестве объекта исследования был выбран вид *Ulnaria acus* (Kützing) Avoal, который является космополитом, обитающим в пресноводных водоемах Евразии, Северной Америки, Южной Америки, а также других регионах. Целью данной работы было выявление разнообразия генотипов штаммов *U. acus*, выделенных из разных пресноводных экосистем Евразии, на основе анализа фрагмента гена *cox1*, кодирующего субъединицу 1 цитохром-С-оксидазы.

В работе было использовано 20 моноклональных штаммов диатомовых водорослей из оз. Байкал (коллекция отдела ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН), а также 3 штамма из Коллекции диатомовых водорослей Мирового океана (WODC) Карадагской научной станции (Россия), отобранные из оз. Рица и оз. Голубого (Абхазия).

Филогенетический анализ фрагмента гена *cox1* моноклональных штаммов *U. acus* из разных мест обитания показал, формирования трех клад (рис. 1).

Клада 1 является самой многочисленной и включает в себя штаммы, которые были выделены из проб, отобранных из оз. Рица (Абхазия), оз. Байкал (Россия), оз. Фролиха (Россия), р. Эрдер (Франция), р. Сарта (Франция). Клада 2 содержит последовательности штаммов из географически удаленных водоемов: оз. Голубое (Абхазия), оз. Байкал (Россия), р. Эрдер (Франция). Штаммы *U. acus* выделенные из оз. Матана (Индонезия) формируют отдельную 3 кладу. Два штамма выделенные из пробы фитопланктона оз. Рица принадлежат к 1 кладе. В свою очередь штамм Г.21.0309-ОС выделенный из оз. Голубое при-

вида была показана для *cox1* штаммов *U. acus*, выделенных из пробы в оз. Байкал в 3 км от с. Байкальское [2]. Было показано, что использование фрагмента гена *rbcL* (большая субъединица рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы) в пробах, взятых из водоемов Европы, не показало генетического разнообразия в зависимости от географического положения для видов родов *Ulnaria* и *Fragillaria* [1]. Результаты, полученные в нашей работе, позволяют утверждать, что анализ маркерного гена *cox1* позволяет разделить *U. acus* на отдельные генотипы, тем самым показать генетическую гетерогенность популяций данного вида.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект номер 121032300191-3.

Список литературы

1. Co-occurrence, ecological profiles and geographical distribution based on unique molecular identifiers of the common freshwater diatoms *Fragilaria* and *Ulnaria* / M. Kahlert [et al.] // *Ecological Indicators*. 2022. Vol. 141. P. 1–13. Art. 109114. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109114>.
2. Genotypic diversity of *Ulnaria acus* (Kützing) Aboal from Eurasia / A. M. Marchenkov [et al.] // *Limnology and Freshwater Biology*. 2022. Vol. 6. P. 1705–1711. <https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-6-1705> РИНЦ.

УДК 575.8+574.9

ИЗУЧЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ПОПУЛЯЦИЙ *ANEMONE ALTAICA* (RANUNCULACEAE) В ЮЖНОЙ СИБИРИ

П. Е. Нелюбина¹, В. В. Павличенко^{1,2}, М. В. Протопопова^{1,2}

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
nelubina01@mail.ru

The study was aimed to establish of the phylogeographic structure of a relict plant *Anemone altaica* (Ranunculaceae) in South Siberia. The molecular genetic analysis showed that a partial disjunction of the species range could happen due to the Pleistocene cooling followed by its postglacial recolonization and restoration of the continuous range along the northern macroslope of the Khमार-Daban Ridge during more favorable climatic conditions in the Holocene.

Работа была направлена на изучение пространственно-генетической структуры и филогенетических взаимоотношений популяций *Anemone altaica* Fisch. ex С. А. Меу. в Южной Сибири. *Anemone altaica* – вид травянистых растений семейства Ranunculaceae с северо-восточноевропейско-сибирским распространением, входящий в группу родства *A. nemorosa* L. Рядом авторов вид определяется как неморальный третичный реликт [1]. В отдельных регионах России *A. altaica* имеет статус редкого или уязвимого вида, и на территории Южной Сибири включен в Красные книги Иркутской области (2020) и Республики Бурятия (2013). В Южном Прибайкалье на северном макросклоне хр. Хамар-Дабан находится оторванный от основного крайний восточный участок ареала. Хамар-Дабан является рефугиумом для неморальных реликтовых видов, которые сохранились здесь после серии плейстоценовых похолоданий. Анализ распространения реликтовых видов на хр. Хамар-Дабан, проведенный нами ранее, позволил предположить существование 4 плейстоценовых микрорефугиумов, расположенных в долинах рек Утулик и Бабха (I), Снежная (II), Переемная (III), Мишиха (IV) [1]. Поскольку *A. altaica* является элементом третичного неморального комплекса, установление ее филогеографической структуры может быть полезным в формировании концепции исторического развития этого таксона, а также для понимания влияния позднекайнозойских климатических изменений на формирование современной растительности Южной Сибири и Северной Азии. Кроме того, определение генетического разнообразия и набора характерных гаплотипов популяций редких и нуждающихся в охране видов, к которым относится *A. altaica*, является важным условием для разработки мер по их сохранению и восстановлению.

Сбор образцов для молекулярно-генетического анализа проводили из нескольких популяций *A. altaica* в предгорьях хр. Хамар-Дабан (поймы рек Безымянная, Утулик, Хара-Мурин, Снежная, Большой Мамай, Выдриная, Осиновка, Мишиха, Мантуриха, Мысовка, Большая Речка, Еловка), Западного Саяна (поймы рек Большой Кебез, Большой Он, Карасибо и Нижняя Буйба) и Алтай

(Горно-Алтайский ботанический сад, Семинский перевал). Выделение препаратов общей ДНК проводили ЦТАБ методом [3] с авторскими модификациями [4]. В качестве молекулярных маркеров использовали регионы пластидной ДНК: *trnL* и *trnL-trnF*. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси с использованием ДНК-полимеразы GoTaq Flexi (Promega, США) и пары праймеров (с + е), разработанных для цветковых растений [5] с финальной концентрацией 250 нМ каждого праймера. Полученные ампликоны электрофоретически отделяли от компонентов реакции, очищали и секвенировали по методу Сэнгера. Филогенетический анализ проводили методом максимального правдоподобия (ML) в MEGA v. 6.06 с использованием трехпараметрической модели Тамуры (T92) и байесовским анализом (BI) на основе метода Монте-Карло для марковских цепей с использованием модели НКУ, адаптированной под модель T92, для нуклеотидных последовательностей, и F81-подобной модели для бинарных данных (делеции/инсерции) в MrBayes v.3.2.7.

Филогенетический анализ показал наличие как минимум трех филогеографических групп *A. altaica* на хр. Хамар-Дабан, которые могли сформироваться в результате их изоляции в течение ледниковых максимумов плейстоцена. В популяциях восточного участка хребта выявлено три пластотипа (P1, P2 и P5), в популяциях из центральной части – пластотипы P2 и P4, в крайне западных популяциях – пластотипы P3 и P4. Географическое распределение выявленных пластотипов может свидетельствовать о частичной фрагментации ареала *A. altaica* в пределах Хамар-Дабана в течение плейстоценовых похолоданий. Западные популяции, несущие пластотип P3, были приурочены к микрорефугиуму I. Восточные популяции, несущие пластотипы P1, P2 и P5 приурочены к микрорефугиуму IV. Популяции центральной части хребта, несущие пластотипы P2 и P4 приурочены к микрорефугиумам II и III. Зона вторичного контакта между центральной и восточными группами приходится на восточную границу микрорефугиума II (р. Выдриная) и на центральную часть микрорефугиума III (р. Осиновка, пос. Танхой), между центральной и западной группами – на восточную границу микрорефугиума I (реки Бабха и Утулик), где одновременно обнаруживаются гаплотипы из разных географических участков. Полученные данные соответствуют филогеографическим паттернам других неморальных реликтов хр. Хамар-Дабан, например, *A. baicalensis* Turcz. и *Eranthis sibirica* DC., которые были определены нами ранее [2; 4]. Данный факт свидетельствует в пользу гипотезы существования плейстоценовых микрорефугиумов на хр. Хамар-Дабан.

Филогенетический анализ показал, что западносаянские и алтайские популяции имели общий пластотип, что свидетельствует об их едином происхождении и начале дивергенции между ними и популяциями с хр. Хамар-Дабан. Один из пластотипов, выявленных в популяциях восточной части хр. Хамар-Дабан (P1), являлся наиболее близким к пластотипу, характерному для популяций с Западного Саяна и Алтая. Остальные пластотипы, обнаруженные в популяциях с хр. Хамар-Дабан (P2-P5), образовывали общую хорошо поддерживаемую кладу с близкородственными видами. Таким образом, филогенетический

анализ на основе пластидной ДНК не выявил четкой дивергенции *A. altaica* и некоторых других близкородственных видов, что нарушает монофилию южно-сибирских популяций *A. altaica*. Это может свидетельствовать о двойственном происхождении пластотипов южносибирских популяций, например путем гибридизации с близкородственными видами. Кроме того, популяции с восточной и центральной частей хр. Хамар-Дабан, несущие среди прочих пластотип Р1, по всей видимости, также имеют двойственное происхождение, поскольку их особи принадлежат к различным филогенетическим линиям.

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к оборудованию, гербарий ИГУ за монтирование и возможность размещения и хранения ваучерных образцов, Чепиногу В. В. за помощь в полевых исследованиях и за предоставление сборов материала с Алтая. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00501, <https://rscf.ru/project/23-24-00501/>.

Список литературы

1. Выявление вероятных плейстоценовых микрорефугиумов на северном макросклоне хребта Хамар-Дабан (Южное Прибайкалье) / В. В. Чепинога [и др.] // Сибирский экологический журнал. 2017. Т. 24, № 1. С. 44–50.
2. Филогеографическая структура *Anemone baicalensis* (Ranunculaceae) на основе полиморфизма пластидной ДНК (*trnL-trnF*) как подтверждение существования плейстоценовых микрорефугиумов на хр. Хамар-Дабан / М. В. Протопопова [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2019. Т. 30. С. 3–15.
3. Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemical Bulletin. 1987. Vol. 19. P. 11–15.
4. Protopopova M. V., Pavlichenko V. V. *Eranthis* Salisb. (Ranunculaceae) in South Siberia: Insights into Phylogeography and Taxonomy // Diversity. 2022. Vol. 14. P. 779.
5. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA / P. Taberlet [et al.] // Plant molecular biology. 1991. Vol. 17. P. 1105–1109.

УДК 57.063.7

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ТАКСОНОВ *ULNARIA* И *FRAGILARIA* (BACILLARIOPHYCEAE) НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И ДАННЫХ МОРФОЛОГИИ И ПОЛОВОГО ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ

Д. П. Петрова, Ю. Р. Захарова, А. М. Марченков, Ю. С. Букин,
А. А. Морозов, Ю. П. Галачьянц, Е. Д. Бедошвили, Ю. А. Подунай,
О. И. Давидович, Н. А. Давидович, Е. В. Лихошвай

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
Карадагская научная станция им. Т. И. Вяземского – природный заповедник РАН,
г. Феодосия, Россия
daryapetr@gmail.com

Fragilaria and *Ulnaria* are closely related genera of diatoms, which identification is unclear. We studied strains isolated from Lake Baikal and compared its with strains from freshwater reservoirs in Europe and Asia using phylogenetic methods and methods for species delimitation, microscopy and mating experiments. The analysis made it possible to develop an optimal approach for the species identification of individual strains and to identify among the studied strains *F. radianse*, *U. asus*, *U. ulna* and *U. danica*.

Пеннатные бесшовные диатомеи рода *Synedra* Kützing – одни из основных продуцентов оз. Байкал, они играют важную роль в весеннем цветении фитопланктона в озере, и являются модельным организмом для многих экспериментальных исследований. В результате недавней таксономической ревизии рода *Synedra* многие пресноводные виды были перенесены в рода *Ulnaria* и *Fragilaria* – два близкородственных рода диатомовых водорослей, границы и описание нескольких видов которых неясны. Целью настоящего исследования было разграничить морфологически сходных таксонов *Ulnaria* и *Fragilaria*.

Мы исследовали штаммы, выделенные из оз. Байкал, и сравнили их со штаммами из пресноводных водоемов Европы и Азии с использованием методов филогенетической и видовой делимитации, световой и электронной микроскопии и экспериментов по межклоновому скрещиванию. Всего в работе было выделено 41 штамм из оз. Байкал и 8 из оз. Лабынкыр. 14 штаммов, выделенных из озер Хубсугул (Монголия), Матано (Индонезия) и р. Эрдр (Франция), было получено из Коллекции диатомовых водорослей мирового океана Карадагской научной станции (Феодосия, Россия). Все штаммы были идентифицированных как *Ulnaria* или *Fragilaria* на основе морфологических данных и анализа фрагмента гена 18S рРНК. Для работы также были использованы морфометрические данные, полученные ранее в Королевском ботаническом саду Эдинбурга (Эдинбург, Великобритания) и Коллекции культур Тонон (Тонон-ле-Бен, Франция).

Результаты филогенетического анализа фрагментов генов *rbcl* показали, что байкальская клада *Fragilaria radians* независима от других представителей рода. Среди *Ulnaria* мы обнаружили следующие группы филогенетических де-

ревьев *rbcl* на видовом уровне: *U. acus*, *U. ulna* и *U. danica*. Генетическая дистанция между родами колебалась в пределах 3,9–10,2 % замен в гене *rbcl* и 3,2–11,5 % замен в 18S рРНК. Граница между внутривидовым и межвидовым полиморфизмом для изученных видов *Ulnaria* и *Fragilaria* в этих маркерных генах составила около 0,8 % замен.

Для описания морфологии по данным световой и электронной микроскопии были использованы следующие признаки: длина и ширина в центре створки, ширина створки на апексе и под ним, плотность штрихов в 10 мкм, плотность ареол на 10 мкм, и форма шипов на апексе и наличие латеральных шипов на створке. По данным PCA анализа морфометрические признаки отдельных штаммов показали их изменчивость и разделение на *F. radians*, *U. acus* и *U. ulna* вместе с *U. danica*. Выделенные нами штаммы *F. radians* и *U. acus* имели сходные морфологические особенности формы створки, ее длины и ширины, а также перекрывающиеся диапазоны плотности штрихов на 10 мкм. Однако эти два вида имели некоторые различия в форме апикальных концов створки, а также апикальных и латеральных шипов – для створок *F. radians* было характерно наличие латеральных шипов и неправильная форма апикальных. Створки *F. radians* и *U. acus* различались также плотностью ареол на 10 м (60–80 и 40–60, соответственно).

Результаты проведенных экспериментов по скрещиванию некоторых штаммов указывают на репродуктивную совместимость штаммов *U. acus* из всех изученных популяций (озера Байкал, Хубсгул, Матано и р. Эрдре). Половое воспроизведение никогда не наблюдалось в моноклональных культурах ни между штаммами вида *U. acus*, ни со штаммами *Fragilaria*, определенными как *F. radians*.

Оценка различий пространственного и временного распределения *U. acus* и *F. radians* на основе данных метабаркодирования, позволили обнаружить отчетливые сезонные пики и отличие пространственного распределения этих двух видов, которые не удавалось выявить ранее при использовании классических методов мониторинга фитопланктона в оз. Байкал.

Таким образом, полученные данные впервые позволили разделить морфологически сходных представителей родов *Ulnaria* и *Fragilaria*. Предложенный в работе подход может быть рекомендован для идентификации как уже известных, так и новых видов в пределах данных таксонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проекты номер 121032300191-3 и 121032300019-0.

УДК 577.3

СРАВНЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ЭНДОГЛЮКАНАЗ ИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ С РАЗНЫМИ ТЕМПЕРАТУРНЫМИ ПРЕДЕЛАМИ РОСТА

О. С. Петухова, А. А. Приставка, В. П. Саловарова

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
petukhova4olga@gmail.com*

In this work, a comparative analysis of endoglucanases with different temperature optima was carried out using multiple alignment methods. It was found that, to a greater extent, sequences are clustered in accordance with their taxonomic features, as well as depending on their class, but there are exceptions in which there could be an influence of temperature conditions on the amino acid sequence or the probability of a horizontal gene transfer.

Целлюлолитические ферменты находят применение во многих областях промышленности [1]. Целлюлазы с высокой термостабильностью имеют большой спрос, что связано с их коротким периодом гидролиза за счет высокой удельной активности фермента, меньшим риском загрязнения в процессе разложения и меньшими затратами энергии на процесс охлаждения после предварительной обработки [2]. Целлюлазы из психрофильных организмов широко востребованы в разных отраслях практической деятельности благодаря своей стабильности при низких температурах [3].

В настоящее время причины термостабильности и холодоактивности целлюлаз недостаточно изучены. Исследование разных групп целлюлаз с помощью биоинформатических методов может позволить понять взаимосвязь между термостабильностью ферментов и их структурными особенностями.

Цель работы заключается в том, чтобы провести сравнительную оценку аминокислотных последовательностей эндоглиюканаз из крупных таксономических групп и различных температурных оптимумов.

Для анализа из баз данных GenBank и UniProt было выбрано 105 аминокислотных последовательностей эндоглиюканаз. В выборку вошло по 35 аминокислотных последовательностей, принадлежащих мезофильным, термофильным и психрофильным организмам. Из отобранных последовательностей 33 принадлежат грибным организмам, 59 бактериальным, 13 архейным.

Выравнивание полноразмерных аминокислотных последовательностей эндоглиюканаз с разным температурным оптимумом и построение дендрограмм было проведено с помощью программы MEGA версии 11.0.9. Выравнивание последовательностей осуществлялось по алгоритму ClustalW, а построение дендрограмм с использованием модели генетических дистанций Maximum Likelihood.

Анализ полученных результатов (рис. 1) позволяет выделить следующие закономерности:

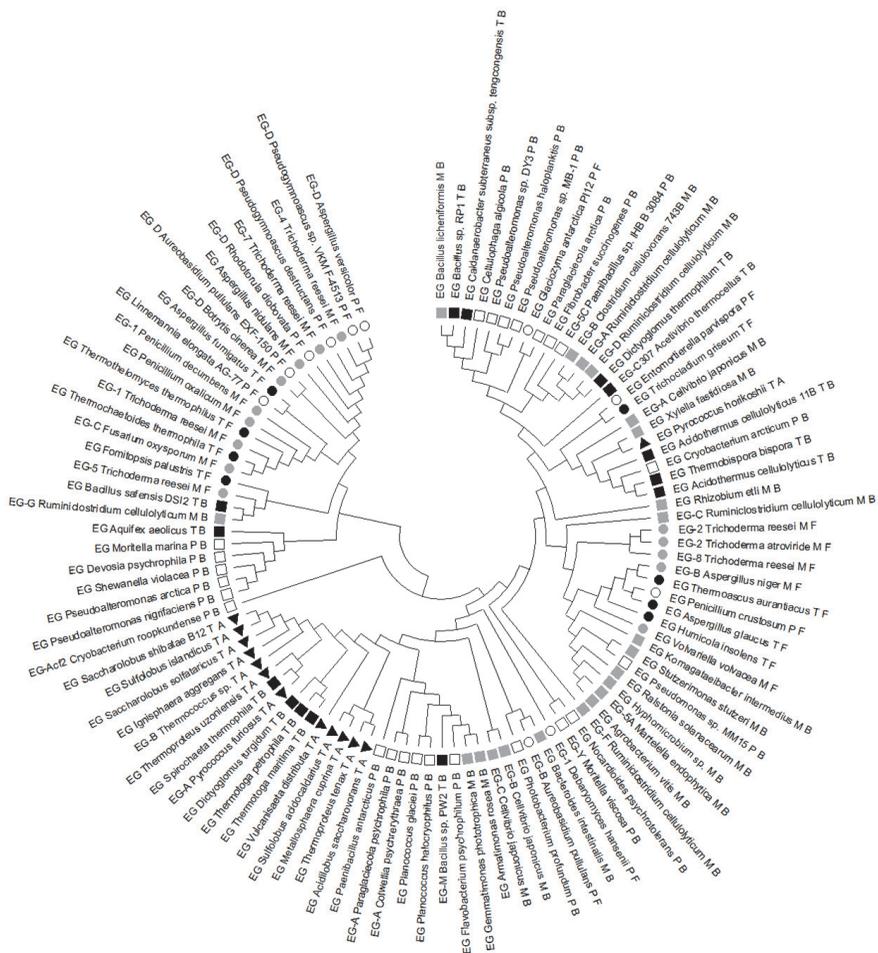


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основании полноразмерных последовательностей эндоглюканаз разных таксонов: красным обозначены термофильные организмы, чёрным – мезофильные, синим – психрофильные; кругами – бактерии, квадратами – археи, треугольниками – грибы

1. Последовательности эндоглюканаз кластеризуются преимущественно по таксономическому признаку.
2. На распределение кластеров грибных ферментов влияет тип эндоглюканаз. Например, разные типы эндоглюканаз *Trichoderma reesei* локализованы в разных ветвях дендрограммы.
3. Наблюдаются случаи сходства первичных структур ферментов из разных таксонов, но имеющих близкий температурный оптимум. Например, грибная эндоглюканаза психрофила *Glaciozyma antarctica* кластеризуется с последо-

вательностями психрофильных бактерий. Последовательность архейной гипертермофильной эндоглюканазы *Pyrococcus horikoshii* попала в группу к бактериальным и грибным последовательностям эндоглюканаз с разными температурными оптимумами. Эндоглюканазы термофильных бактерий *Spirochaeta thermophila*, *Dictyoglomus turgidum*, *Thermotoga maritima* и *Thermotoga petrophila* находятся в одних узлах дендрограммы с последовательностями эндоглюканаз гипертермофильных архей. Можно предложить два объяснения наблюдаемых закономерностей: 1) результат действия естественного отбора по температурному фактору; 2) горизонтальный перенос генов между разными видами.

Для получения более однозначных результатов планируется модифицировать процедуру выравнивания и использовать не полноразмерные последовательности, а фрагменты, соответствующие функциональным доменам эндоглюканаз.

С другой стороны, дополнительная информация о связи структуры целлюлаз и термооптимумов может быть получена при анализе особенностей распределения аминокислотного профиля в белках из исследуемой выборки.

Список литературы

1. Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications / A. Sharma [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2016. Vol. 8, N 179. P. 1346–1380.
2. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review / F. Akram [et al.] // Renewable Energy. 2018. Vol. 122. P. 225–238.
3. Kasana R., Gulati A. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review // Journal of Basic Microbiology. 2011. Vol. 51. P. 272–279.

УДК 579.8

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ ВИДА *WICKERHAMOMYCES ANOMALUS*

С. Дэлгэрмаа

Институт промышленных технологий

*Монгольский государственный университет науки и технологий, г. Улаанбаатар, Монголия
delgermaa_s@must.edu.mn*

The purpose of this study is the isolation and identification of yeast from wild berries with antibacterial activity. We conducted a microbiological and molecular biological study of this strain and assigned it to the species *Wickerhamomyces anomalus*.

Введение. В природе распространены многие виды микроорганизмов, значение которых до конца не изучены. Некоторые виды дрожжей, используемые как промышленный штамм, способны выделять токсин, который уничтожает другие виды микроорганизмов. Впервые о такой способности дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* отмечал в 1877 г. Луи Пастер, а в 1963 г. впервые были выделены и идентифицированы киллер-дрожжи [1]. Фенотипические признаки этих дрожжей изучены Маковер и Беван [2; 3]. Раньше эти дрожжи относились к роду *Pichia*, виду *Hansenula anomala*. На основе результатов филогенетических исследований их выделели в отдельный вид *Wickerhamomyces anomalus* [4].

Цель работы – выделение и идентификация дрожжей из лесных ягод, обладающих антибактериальной активностью. Для достижения данной цели поставлены следующие задачи:

1. Выделение из лесных ягод штамма дрожжей, обладающих антибактериальной активностью.
2. Проведение микробиологических исследований для определения морфокультуральных и физиолого-биохимических признаков.
3. Проведение молекулярно-биологического исследования с целью определения видовой принадлежности.

Методы исследования. Для исследований мы использовали традиционные методы микробиологических исследований. Для проведения цепной полимеразной реакции мы придерживались следующего протокола.

А. Подготовка агароз-геля.

Б. Проведение секвенс анализа ДНК с помощью онлайн программы *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [5].

В. Построение филогенетического древа провели с помощью программ *Биоэдит (BioEdit)*, *Максимум Лайкхлх (DNA Maximum Likelihood program version 3.5 с Felsenstein and by the University of Washington. Written by Joseph Felsenstein)* программы *МЕГА7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7)*, *UPGMA* [6].

Результаты исследований. Нами выделен дрожжевой штамм из лесных ягод. Для определения видовой принадлежности нами проведена ITS-гелевая электрофорезия (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что культуры (2, 8) (3, 4, 5) отличаются от других культур. Эти штаммы по генетическим признакам могут быть отнесены к одному роду. С помощью BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast.cgi>) онлайн-программы мы провели сравнение нуклеотидной последовательности ДНК культур.

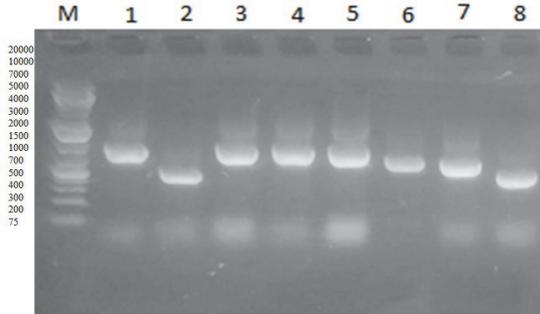


Рис. 1. Результат гелевой электрофорезии

Таблица 1

Результаты онлайн поиска

Культура	ITS1-5.8S-ITS2	Из онлайн программы
2	<i>Pichia fermentans</i>	Находятся на поверхности ягод, листьев, в воде и почве
8		
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Находится на поверхности ягод, используют в бродильном производстве как производственный штамм
4		
5		
6	<i>Rhodotorula muliganosa</i>	Среда обитания – почва, вода, вино, молоко
7	<i>Whicherhamyces. anomalus</i>	Предупреждает заражение <i>Botrytis</i> , дрожжи-киллер

Ссылка	Max	Ident	Query	E	Align	Accession
10	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
11	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
12	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
13	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
14	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
15	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
16	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
17	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
18	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
19	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
20	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
21	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
22	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
23	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
24	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
25	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
26	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
27	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
28	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
29	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
30	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
31	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
32	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
33	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
34	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
35	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
36	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
37	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
38	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
39	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
40	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
41	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
42	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
43	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
44	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
45	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
46	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
47	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
48	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
49	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1
50	100%	100%	100%	0.0	99%	AY046221.1

Рис. 2. Культура -7 Wickerhamomyces anomalus(Pichia anomala), идентификация 99 %

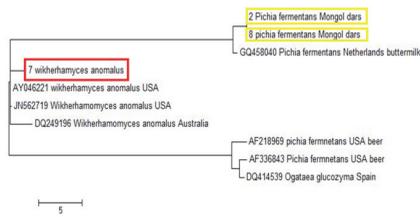


Рис. 3. Филогенетическое древо культур дрожжей 3.2, 8, 7

При проведении анализа с помощью *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) секвенс анализ ДНК дрожжей идентичны на 99 %.

Для построения филогенетического древа дрожжей мы использовали программу MEGA7 (Molecular evolutionary genetics analysis) Maximum likelihood.

Из рис. 3 видны два основных и три разветвленных ветвей. Культуры дрожжей 2 и 8, выделенных из лесных ягод, в генетическом отношении не имеют различий и относятся к виду *Pichia fermentans*. Культура 7 в филогенетическом отношении близка к дрожжам, выделенных в Австралии, и относится к виду *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*).

Из выделенных дрожжей мы отобрали штамм культуры 7 для проведения микробиологического исследования.

Таблица 2

Морфологические признаки

№	Культура дрожжей	Диаметр колоний, мм	Форма колоний	Цвет колоний	Поверхность	Форма клеток
1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	4–5	Круглая	Розовый	Гладкая	Эллипсоид

Дрожжи вида *Wickerhamomyces anomalus* в течение 21 дня не образовывали спор. При определении температурной зависимости данная культура дает хороший рост при температуре 20–30 °С, при 37 °С рост становится скудным. Данный штамм дает хороший рост в среде с различными органическими кислотами, не обладает уреазной активностью (табл. 3).

Таблица 3

Некоторые физиолого-биохимические признаки

Культура дрожжей	Органические кислоты			Уреазная активность
	Аскорбиновая	Сукциниловая	Уксусная	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	–	+	+	–

Для определения антибактериальной активности мы использовали тест бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (грам отрицательные), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (грам положительные). Мы определили зону подавления. Результаты исследования показаны в табл. 4.

Таблица 4

Антибактериальная активность

Культура дрожжей	Размер зоны подавления, мм			
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	7±0,5	8,2±0,70	6±0,62	5,8±0,80

Выводы

- При определении нуклеотидной последовательности выделенный штамм относится к виду *Wickerhamomyces anomalus*.
- При определении морфокультуральных и физиолого-биохимических признаков по определителю Куртцмана данная культура относится к виду *Wickerhamomyces anomalus*.
- Данная культура обладает антибактериальной активностью и подавляет рост как грам положительных, так и грам отрицательных бактерий.

Список литературы

1. https://en.wikipedia.org/wiki/Killer_yeast
2. Buyuksirit T., Kuleasan H. Antimicrobial Agents Produced by Yeasts. 2014.
3. Schmitt M. J., Breinig F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application // FEMS Microbiology Reviews. 2002. Vol. 26. P. 257–276.
4. Kurtzman & Fell. The Yeasts – A Taxonomic Study, 1998. 904 p.
5. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
6. Sokal R., Michener C. A statistical method for evaluating systematic relationships // University of Kansas Science Bulletin. 1958. Vol. 38. P. 1409–1438.

УДК 575.86

ВНУТРИВИДОВОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД В ЮЖНОМ БАЙКАЛЕ И РЕКЕ АНГАРЕ

А. Е. Саранчина¹, П. А. Смирнова¹, Е. Б. Индосова¹, А. Д. Мутин¹,
П. Б. Дроздова^{1,2}

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²Байкальский исследовательский центр, г. Иркутск, Россия

alexandra147801@gmail.com

This work examines the genetic diversity of Baikal amphipods from southern Baikal and the Angara river. The analysis performed by Sanger sequencing the cytochrome c oxidase and 18S rRNA genetic markers of widespread species *Eulimnogammarus verrucosus*, *E. vittatus* and *E. marituji* showed substantial genetic variation within these species, while the geographic distribution of the representatives of different haplogroups was species-specific.

Бассейн Байкала – точка активного видообразования. Одна из самых активно развивающихся групп – это отряд амфипод. *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstfeldt, 1858), *E. vittatus* (Dybowsky, 1874) и *E. marituji* (Bazikalova, 1945) – одни из самых широко распространенных видов литорали оз. Байкал и его единственного истока, р. Ангары [2]. В последние десятилетия появляется все больше научных работ о внутривидовом генетическом разнообразии амфипод Байкала в связи с большим распространением методов молекулярной филогенетики. Известно, что для таких видов, как *E. verrucosus* и *E. vittatus* [6], исток Ангары является географическим барьером, препятствующим смешению разных гаплогрупп вида, в то время как для видов *E. cyaneus* (Dybowsky, 1874) [6], *Gmelinoidea fasciatus* (Stebbing, 1899) [5] и *Babr nigromaculatus* (Dorogostaisky, 1922) [4] – нет.

В данной работе мы хотим сравнить генетическое разнообразие амфипод видов *E. verrucosus*, *E. vittatus*, *E. marituji* в Ангаре и южном Байкале по маркерным генам цитохром-с оксидазы (COI) и 18S рРНК.

Отлов животных осуществляли с помощью гидробиологического сачка на побережье оз. Байкал в районе порта Байкал, поселков Листвянка и Большие Коты, а также на побережье Ангары в г. Иркутске. Из отловленных амфипод выделяли ДНК с помощью коммерческого набора «ДНК-Сорб». Целевые фрагменты амплифицировали с помощью праймеров с известными последовательностями [6]. Полученные ПЦР-продукты очищали набором Cleanup Standard и секвенировали по методу Сэнгера на приборе «Нанофор-05». Получившиеся последовательности выравнивали в программе Ugene V 41.0 [8] алгоритмом MUSCLE. Сети гаплотипов строили в программе SplitsTree V 4.18.1 [7].

Согласно сетям гаплотипов, построенным по обоим генам, Ангару населяют представители южной гаплогруппы вида *E. verrucosus*. Примечательно, что южные представители обитают на обоих берегах реки, в то время как в Байкале они обитают только на южном побережье. Также вместе с ними из Ангары получены последовательности *E. oligacantus* (Bazikalova, 1945), который

имеет разный статус согласно разным авторам: по систематике А. Я. Базикаловой он является подвидом *E. verrucosus* [1], а по систематике Р. М. Камалтынова – отдельным видом [3].

Представители *E. vittatus* на южном побережье Байкала так же, как и представители *E. verrucosus*, разделены истоком Ангары согласно данным по обоим генам: вблизи пос. Листвянка обитают представители западной гаплогруппы, а около порта Байкал, согласно полученным нами данным – южной. Вместе с тем разнообразие *E. vittatus* в р. Ангаре принципиально отличается: там обнаружены представители с западного берега озера, а также новая гаплогруппа COI для этого вида. При этом последовательности новой гаплогруппы из Ангары совпадают с последовательностями COI *E. vittatus*, выловленных с побережья у села Горячинск, которое расположено на восточном берегу центральной котловины озера.

Также в нашей работе впервые было обнаружено, что *E. marituji* образует как минимум две гаплогруппы по обоим маркерным генам. Одна из них заселяет западное побережье Байкала в поселках Листвянка и Большие Коты. Вторая гаплогруппа обнаружена на побережье Ангары в Иркутске.

Таким образом, в данной работе показано существенное генетическое разнообразие внутри распространенных морфологических видов литоральных байкальских амфипод рода *Eulimnogammarus*, причем географическое распределение разных гаплогрупп видоспецифично.

Работа поддержана грантом РНФ (22-14-00128).

Список литературы

1. Базикалова А. Я. // Труды Байкальской лимнологической станции Академии наук СССР. М. ; Л., 1945. №9.
2. Тахтеев В. В. Очерки о боклоплавах озера Байкал: Систематика, сравнительная экология, эволюция. Иркутск, 2000.
3. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна / О. А. Тимошкин [и др.]. Новосибирск : Наука, 2009.
4. Systematics of the Baikalian *Babr* (Crustacea: Amphipoda: Pallaseidae) / М. Е. Daneliya [et al.] // Zootaxa. 2009. Vol. 2276, N 1. P. 49–68.
5. Population structure of the Baikalian amphipod *Gmelinoides fasciatus* (Stebbing) / G. V. Gomanenko [et al.] // Russian Journal of Genetics. 2005. Vol. 41. P. 907–912.
6. Indication of ongoing amphipod speciation in Lake Baikal by genetic structures within endemic species / A. Gurkov [et al.] // BMC Evolutionary Biology. 2019. Vol. 19. P. 1–16.
7. Huson D. H. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data // Bioinformatics (Oxford, England). 1998. Vol. 14, N 1. P. 68–73.
8. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / К. Okonechnikov [et al.] // Bioinformatics. 2012. Vol. 28, N 8. P. 1166–1167.

УДК 574.583

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕРТИКАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЗОПЛАНКТОНА С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМПЛЕКСНОЙ МЕТОДИКИ СЕТНЫХ ЛОВОВ

А. В. Темных, М. И. Силаков, В. В. Мельников, Е. С. Чудиновских

*Федеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского РАН, г. Севастополь, Россия
atemnykh@yandex.ru*

The study is based on the complex use of a series of vertical fishing with a plankton net with closure and towing of a cassette sampler at different depths. During the analysis, it was noted that in the presence of a high concentration of plankton in a narrow layer, sampling only with a Juday vertical fishing net does not give a representative result, because averages values over layers with high and low abundance. The integrated method of net fishing used made it possible to clarify some features of the vertical distribution of mesoplankton and its components.

Изучение вертикального распределения зоопланктонных видов в разные периоды суток позволяет получить информацию об их вертикальной суточной миграции. Данная информация полезна для выявления глубин скопления кормовой базы планктоноядных рыб и выработки методик и рекомендаций для вылова промысловых видов. Кроме того, понимание вертикального распределения позволяет синхронизировать данные экспрессных и дистанционных методик оценок биоты с реальным распределением в исследуемых точках.

Исследование основано на использовании серии вертикальных ловов планктонной сетью с замыканием и буксировании кассетного пробоотборника на разных глубинах (рис. 1). В качестве сети выбрана сеть Джели. В качестве буксируемого сетного пробоотборника предлагается кассетный планктонометр Мельникова-Темных (КПМТ). Исследование проведено в темное и светлое время суток в мае в прибрежье северной части Чёрного моря (юго-запад полуострова Крым). Сетью Джели облавливали десятиметровые слои с шагом 10 м: 0–10, 10–20, 20–30, 30–40, 40–50 м. Сбор проб КПМТ выполняли в режиме буксировки со скоростью 2,5–3 узла по циркуляции вокруг места вертикальных ловов сетью Джели. КПМТ – это полностью автоматический прибор, который собирает 10 проб одного объема за 20 мин буксировки (10 циклов открытия и закрытия сетей) с помощью сетевого конуса с ячейей 115 мкм. При данной скорости буксировки и площади входного отверстия 0,05 м², одна сеть фильтрует 7,7–9,3 м³ воды. В исследовании использовали буксировку прибора с последующим опусканием на каждые пять метров после закрытия очередной сети планктонометра. Таким образом, глубины буксировки планктонометра приходились на середину и нижнюю границу каждого вертикального горизонта лова сетью Джели. Параметры морской среды: температура и соленость получены с помощью вертикального зондирования гидробиофизического комплекса «Сальпа-М».

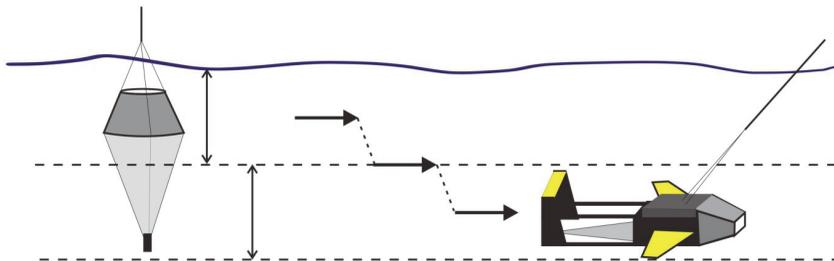


Рис. 1. Комплексное использование сетных ловов

При исследовании вертикального распределения, помимо выявления связей между пиками обилия мезопланктона и абсолютными величинами параметров среды, исследовались взаимосвязи между вертикальными изменениями обилия планктонтов и градиентами температуры, солёности и плотности (зависимости от резкости их изменений).

Общая численность мезопланктона по всему столбу воды 0–50 м достигала 25–30 тыс. экз·м⁻³. Основу планктона во всех слоях составляли веслоногие рачки (до 96 %), в пробах встречались также представители меропланктона (личинки *Bivalvia*, *Gastropoda*), коловратки и *Noctiluca scintillans* (чья общая численность достигала более 3,5 тыс. экз·м⁻³).

По данным ловов сети Джели, численность и биомасса мезопланктона днём и ночью были максимальными в верхнем десятиметровом слое и снижались с глубиной. Ночью в слое 0–10 м биомасса мезопланктона снизилась в два раза, но в процентном соотношении осталась такой же, а в слое 20–40 м биомасса существенно снизилась.

По материалам, собранным КПМТ в дневное время, вертикальный профиль численности мезопланктона имел два пика. Первый наблюдался в верхнем облавливаемом слое на глубине 5 м, ниже наблюдалось уменьшение численности почти в 20 раз. Второй слой скопления планктона зарегистрирован в слое 25–40 м с максимумом на глубине 30 м. Ночью численность в слоях дневных пиков снизилась в два раза.

Вертикальное распределение обилия мезопланктона по данным двух пробоборников имело схожий профиль, с более выраженным пиком на глубине 25–30 м по данным КПМТ. В поверхностном слое основу мезопланктона составляли copepodы *Acartia clausi* и *Paracalanus parvus*, на глубине 30 м – *Pseudocalanus elongatus*, *Oithona similis* и *Paracalanus parvus*. Из кладоцер масово встречался только *Pleopis polyphemoides*, его численность достигала 320 экз·м⁻³. По данным обоих пробоборников, он в течение суток обитал в основном в слое 0–30 м. Численность *Oikopleura dioica* достигала 1150 экз·м⁻³. Основная часть популяции в дневное время находилась в слое 25–35 м, ночью часть популяции осталась в этом слое, часть поднялась в поверхностный слой, что зарегистрировано обоими пробоборниками.

С помощью совместного использования двух разных методик получены несколько противоречивые особенности вертикального распределения динофлагелляты *Noctiluca scintillans*. Так, по данным сети Джеди днём наблюдалось максимальное количество экземпляров в верхнем десятиметровом слое, с глубиной обилие снижалось. Ночью наибольшая концентрация регистрировалась в слое 10 – 30 м. Совершенно другая картина распределения регистрировалась по данным КПМТ. Отмечено два пика численности днём, верхний, небольшой, на глубине 10 м, второй, максимальный, пик концентрации регистрировали на глубине 25 м. Ночью более 70 % популяции концентрировалось в верхнем слое 5–10 м. Такое различие в данных может говорить о слоях тонкой концентрации данного вида в столбе воды. Вертикальный лов сетью Джеди усредняет эти значения и даёт неверное восприятие распределение численности *N. scintillans*. С другой стороны, прицельные ловы этого вида можно делать только понимая причины его распределения, чтобы «попасть» в эти слои.

В дневное время суток распределение по вертикали определялось внешними факторами, наиболее значимым из которых для мезопланктона и копепод были вертикальный градиент солёности (коэффициенты корреляции составили -0,73 и -0,72 соответственно) и плотности (по -0,7), для *N. scintillans* – градиенты температуры и плотности (+0,73 и -0,8 соответственно). Ночью влияние градиентов среды значительно снижалось.

При анализе было отмечено, что при наличии высокой концентрации планктона в узком слое сбор проб только вертикальным ловом сетью Джеди не даёт репрезентативный результат, т. к. усредняет величины по слоям с высокой и низкой численностью. Используемая комплексная методика сетных ловов позволила уточнить некоторые особенности вертикального распределения мезопланктона и его составляющих.

Работа выполнена по теме госзадания 121041400077-1 «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом».

УДК 579.253

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛОКУСОВ АДАПТАЦИИ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

И. С. Федотова, Л. В. Миронова

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск, Россия
fedotova-is95@mail.ru

Adaptation genes contribute to the persistence of *V. cholerae* in changing environmental conditions. This work is devoted to the search for structural features of genomic adaptation markers of *V. cholerae* strains isolated in Siberia and the Far East.

Актуальность. Возбудитель седьмой пандемии холеры характеризуется высокой внутривидовой вариативностью [1]. Кроме основных и дополнительных локусов патогенности геном *Vibrio cholerae* может содержать в своем составе ряд мобильных генетических элементов, кластеров пандемичности и персистентности, а также гены, дифференцирующие вибрионы по серологическим группам и биовариантам для O1 серогруппы. Совокупность современных молекулярно-генетических и биоинформационных методов обеспечивает возможность углубленного исследования генетических детерминант, обуславливающих разнообразие холерных вибрионов как с точки зрения патогенности, так и адаптационного потенциала.

Цель исследования – анализ структуры геномных маркеров адаптации штаммов *V. cholerae* разных серогрупп, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока в 1972–2021 гг.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 88 полных геномов штаммов *V. cholerae* с изученными биологическими свойствами из коллекции ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Согласно серотипированию 57 штаммов принадлежат к O1 серологической группе (с различными профилями по основным генам патогенности), 3 – к O139 серогруппе, 6 – к не O1/O139 серогруппам, 22 штамма являются R-вариантами. Полногеномное секвенирование осуществлялось на платформах MiSeq (Illumina, США), DNBSEQ-G50RS (MGI, Китай) и MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Оценка качества и фильтрация коротких ридов выполнены программами FastQC v0.12.0 и Trimmomatic v0.32, длинных ридов – MinionQC. R v1.4.2 и Guppy v6.4.8. Гибридные контиги *de novo* получены геномным ассемблером SPAdes v3.13.0. Поиск локальных выравниваний осуществлен инструментом blast+ v2.14.0 и пользовательской базой данных, содержащей нуклеотидные последовательности 72 маркеров адаптации штамма *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor N16961 (синтез маннозочувствительных пилей адгезии, структурных и регуляторных компонентов биопленок [5], некоторых сигнальных молекул QS [2], генов холодового шока [3] и адаптации к из-

менению концентрации NaCl [4]). Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей и их трансляция выполнены в программе MEGA v11, исследование белковой структуры измененных локусов – с помощью веб-сервера гомологии-моделирования белковой структуры SWISS-MODEL.

Результаты исследования. В результате биоинформационного анализа выборки штаммов установлено большое разнообразие их генетических профилей адаптации. 25 штаммов O1 серогруппы с генотипом *ctxAB⁺/tcpA⁺* (токсигенные) и 4 штамма аналогичной серогруппы с генотипом *ctxAB⁻/tcpA⁺* (нетоксигенные с токсин-корегулируемыми пилиями адгезии) показали наибольшую консервативность – они содержат наименьшее число изменений в исследуемых локусах адаптации относительно последовательностей других штаммов, так, процент идентичности референсным последовательностям этой группы показал максимум (100 %) для 58–67 маркеров адаптации у штаммов *ctxAB⁺/tcpA⁺* и для 50–52 маркеров у штаммов *ctxAB⁻/tcpA⁺*. Также отличительной особенностью этих вибрионов стало наличие всех генов ($n = 21$) синтеза вибриоидного экзополисахарида биопленки (кластер *vps*), тогда как у прочих штаммов выборки не были обнаружены маркеры *vpsC*, *vpsD*, *vpsE*, *vpsF*, *vpsG*, *vpsH*, *vpsI* и/или *vpsU*. Вибрионы O1 серогруппы, не имеющие в геномах основные детерминанты патогенности, при большом отличии генов адаптации от штаммов *ctxAB⁺/tcpA⁺* и *ctxAB⁻/tcpA⁺* показали высокий уровень группировки между собой – 18 штаммов с разных территорий и разных периодов изоляции имеют одинаковый профиль и, соответственно, образуют единый кластер, остальные 10 штаммов в этот кластер не входят и формируют шесть отличных друг от друга групп, в которые так же входят некоторые не O1/O139-вибрионы и R-варианты. Штаммы O139 серогруппы и два R-варианта, изолированные в летний период 2006 г. из р. Ангара г. Иркутска, а также штамм O139, выделенный из водоема Новосибирской области, в сравнении с остальными штаммами имеют наиболее отличные профили. Среди этих вибрионов есть варианты, в геномах которых значительно изменен маркер дигуанилатциклазы *cdgM*, что повлияло на первичную структуру белка *CdgM*, и отсутствует ген *chiA1*. Кроме того, маркер хитиназы *chiA1* не выявлен у четырех штаммов O1 серогруппы и одного R-варианта. Наибольшее разнообразие внутри серологической группы показали R-варианты, их гены адаптации в некоторых случаях имеют как уникальные, так и схожие профили генов адаптации с профилями вибрионов O1 и O139 серогрупп в пределах одной территории.

Выбранные для изучения четыре маркера холодового шока достаточно консервативны у всех вибрионов: у 34 штаммов они обладают 100 % идентичностью референсным последовательностям, у других 39 штаммов наблюдаются однонуклеотидные замены в локусе *VC_RS17765* в трех различных вариантах, которые не влияют на первичную структуру белка. Для остальных 15 штаммов также характерны точечные мутации в последовательностях других генов холодового шока, при этом единство профилей свойственно только в двух случаях – для четырех R-вариантов из Приморского края и трех вибрионов не O1/O139 серогруппы из Иркутской области.

Заключение. В результате исследования штаммов O1 серогруппы отмечена связь генетических профилей адаптации и наличия в геномах основных генов патогенности, в связи с чем токсигенные и нетоксигенные вибрионы *ctxAB/tcpA*⁺ можно объединить в группу, внутри которой присутствуют локальные различия, ассоциированные в большей степени с территорией изоляции штаммов. Более 50 % нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 *ctxAB/tcpA*⁻ имеют идентичную структуру детерминант адаптации, несмотря на временные и территориальные различия. Для вибрионов O139, не O1/O139 серогрупп и R-вариантов характерны более разнообразные адаптационные генотипы. Структура исследуемых генов холодового шока в большинстве случаев не зависит от серогруппоспецифичности штаммов.

Таким образом, установлена гетерогенность структуры исследованных генетических детерминант адаптации, позволяющая дифференцировать на группы *V. cholerae* разной эпидзначимости, а также внутригрупповая вариативность отдельных локусов. Изучение роли выявленных особенностей геномной организации в реализации адаптационного потенциала позволит расширить понимание экологии возбудителя холеры.

Список литературы

1. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. / А. К. Носков [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. №1. С. 43–51.
2. Parallel quorum-sensing system in *Vibrio cholerae* prevents signal interference inside the host / S. Watve [et al.] // PLoS Pathogens. 2020. №16(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008313>.
3. Response of *Vibrio cholerae* to low-temperature shifts: CspV regulation of type VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton / L. Townsley, M. P. Sison-Mangus, S. Mehic, F. H. Yildiz // Applied and Environmental Microbiology. 2016. Vol. 82, N 14. P. 4441–4452.
4. Shikuma N. J., Yildiz F. H. Identification and characterization of OscR, a Transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae* // Journal of Bacteriology. 2009. Vol. 13, N 191. P. 4082–4096.
5. *Vibrio cholerae* filamentation promotes chitin surface attachment at the expense of competition in biofilms / B. R. Wucher [et al.] // PNAS. 2019. Vol. 116, N 28. P. 14216–14221.

УДК 575

ПОИСК МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ГЕНОМАХ И ТРАНСКРИПТОМАХ

**В. М. Черезова, Т. Ю. Майор, Ю. П. Сапожникова, А. Г. Королева,
Т. В. Сидорова, Л. В. Суханова**

*Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
lcherezova12@yandex.ru*

A search and analysis of transcribed Tc1-like DNA transposons (DTSSa4 group) in the Baikal omul genome was carried out. The effectiveness of the selective suppression PCR (SSP) method in combination with Nanopore sequencing was tested.

Последние годы характеризуются колоссальным ростом информации о присутствии и роли мобильных элементов (МЭ) в геномах эукариотических организмов [1]. В настоящее время известно, что Tc1-подобные ДНК-транспозоны – суперсемейство МЭ с древними корнями, объединяющее глубоко дивергировавшие на протяжении эволюции эукариот монофилетичные ветви – доминируют в геномах многих видов рыб разных отрядов [2]. Имеющаяся информация об эволюции и полиморфизме Tc1-подобных ДНК-транспозонов получена в основном в результате анализа *in silico*. Однако сложность геномов рыб, большое количество копий МЭ, подлежащих анализу, быстрая эволюционная диверсификация и деградация МЭ, требующая трудоемкой ручной обработки, несовершенство программного обеспечения и неполнота существующих баз данных МЭ ограничивает возможности такого анализа [3].

Соответственно, подходы для изучения мобильных элементов не требующие секвенирования всего генома или транскриптома, но обеспечивающие массовое физическое извлечение максимального разнообразия последовательностей целевой группы МЭ и их дальнейший анализ, не теряют, а даже приобретают все большую актуальность. Особенно с появлением методов массового секвенирования протяженных последовательностей (нанопоровое секвенирование).

Одним из таких подходов является использование феномена селективной супрессии ПЦР (ССП), открытого еще в 1994 г. [4], который лежит в основе группы высокоэффективных, взаимодополняющих методов поиска и анализа ДНК и РНК, особенно полезных, когда первичная структура таких молекул неизвестна. Принцип метода заключается в том, что к фрагментам ДНК присоединяются супрессионные адапторы, сконструированные таким образом, что праймеры, комплементарные последовательностям супрессионных адапторов, не могут эффективно отжигаться на матрице и инициировать ПЦР сами по себе. ПЦР эффективно проходит лишь в том случае, когда происходит эффективный отжиг как праймера на адапторную последовательность, так и целевого праймера, например, праймера, комплементарного интересующей последовательности МЭ. Использование эффекта ПЦР-супрессии предотвращает фоновую амплификацию с адаптор-специфических праймеров. Амплифицируются только

фрагменты, несущие целевую последовательность, которые далее подвергаются нанопоровому секвенированию и аннотированию.

Задача данной работы – проверить эффективность метода ССП в сочетании с нанопоровым секвенированием на одной из групп Tc1-подобных ДНК-транспозонов (DTSsa4). В качестве объекта поиска целевых последовательностей выбран байкальский омуль *Coregonus migratorius* Georgi, поскольку у байкальских сиговых было выявлено большое количество транскрибирующихся МЭ данной группы [5].

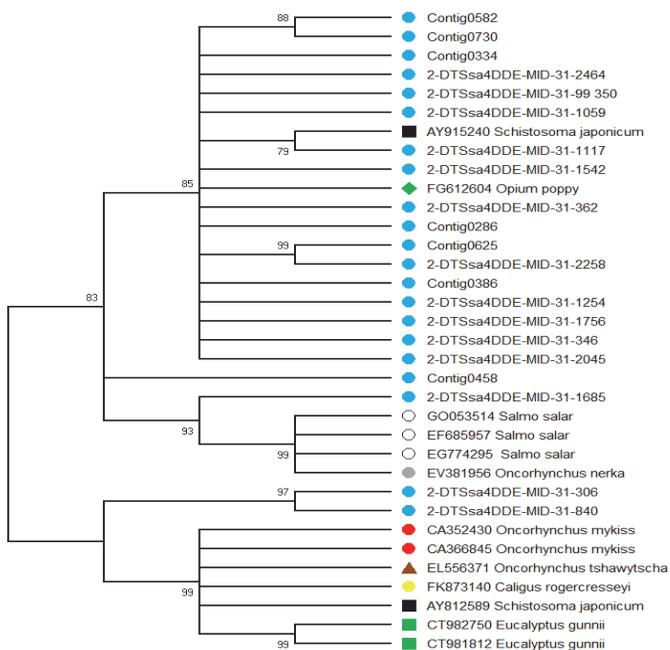


Рис. 1. Филогенетическое древо (ML, GTR+G+I), построенное на основе нуклеотидных последовательностей DTSsa4 Tc1-подобного ДНК-транспозона *C. migratorius* и других видов. Голубым кругом обозначены транскрипты *C. migratorius*

По результатам нанопорового секвенирования фрагментов кДНК омуля, полученных нами с помощью ССП технологии в EST базе данных GenBank найдены транскрипты, гомологичные в основном фрагментам МЭ лососевых рыб (*Salmo salar*, *Oncorhynchus nerka* O. *mykiss*, O. *tshawytscha*), а также других эукариот, в том числе паразитов (трематода *Shistosoma japonicum* и эктопаразитическое ракообразное *Caligus rogercresseyi*). На основе найденных в базе данных транскриптов и части транскриптов, полученных в нашем исследовании для *C. migratorius*, построено филогенетическое древо (рис. 1).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и МОКНСМ в рамках научного проекта № 20-54-44017 (нанопоровое секвенирование), в

рамках проекта РНФ № 23-24-00644 (<https://rscf.ru/project/23-24-00644/>) (биоинформатический анализ, исследование транспозонов), госзадания ЛИН СО РАН 0279-2021-0005 (121032300224-8) и экологического проекта Еп+ (получение аквакультуры сиговых рыб) на базе УНУ «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» (ПАК) ЛИН СО РАН

Список литературы

1. Colonna Romano N. Transposable elements: major players in shaping genomic and evolutionary patterns / N. Colonna Romano, L. Fanti // *Cells*. 2022. V.11.№6. P. 1048. DOI: 10.3390/cells11061048
2. Zong W. Traveler, a new DD35E family of Tc1/Mariner transposons, invaded vertebrates very recently / W. Zong, B. Gao, M. Diaby, D. Shen, S. Wang, Y. Wang, Y. Sang, C. Chen, C. X. Wang, C. Song // *Genome Biol. Evol.* 2020. V.12.№3. P. 66–76. DOI: 10.1093/gbe/evaa034
3. Peccoud J, Analyzing horizontal transfer of transposable elements on a large scale: challenges and prospects / J. Peccoud, R. Cordaux, C. Gilbert // *Bioessays*. 2018. Vol. 40, N 2. DOI: 10.1002/bies.201700177
4. Launer G. A. Simple method for cDNA amplification starting from small amount of total RNA / K. A. Lukyanov, V. S. Tarabykin, S. A. Lukyanov // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 1994. N 6. P. 38–41.
5. Bychenko O. S. Differences in brain transcriptomes of closely related baikal coregonid species/ O. S. Bychenko, L. V. Sukhanova, T. L. Azhikina, T. A. Skvortsov, T. V. Belomestnykh, E. D. Sverdlov // *Bio. Med. Research International*. 2014, Article ID 857329. DOI: 10.1155/2014/857329

УДК 579.26:574.587

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С БЕНТОСНЫМИ ЖИВОТНЫМИ БАЙКАЛА

Т. И. Земская, С. М. Черницына, И. А. Хальзов, Т. Я. Ситникова

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
sveta@lin.irk.ru

The microbial communities associated with invertebrates inhabiting bottom sediments of Lake Baikal were investigated using high-throughput sequencing, scanning electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy.

Интегральными методами (сканирующая электронная микроскопия, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina MiSeq, филогенетический анализ фрагмента гена 16S рРНК) исследованы микробиомы донных беспозвоночных, обитающих в зонах разгрузки минерализованных газосодержащих флюидов разного типа. Наличие микроорганизмов в кишечнике олигохеты из холодного метанового сипа подтверждено методами микроскопии. Анализ библиотек генов 16S рРНК показал, что наибольшее разнообразие микроорганизмов обнаружено в микробиомах нематод, где были идентифицированы представители 11 филумов, участвующих в разных циклах. Среди них выявлены метаногены, нитрификаторы и азотфиксирующие бактерии, а также участники круговорота серы. Метанотрофы присутствовали в микробиомах олигохет и хирономид. Микробиомы нематод, хирономид и батинеллид включали представителей типов *Bacteroidota* и *Firmicutes*, которые связаны с симбиотическими бактериями, обнаруженными у насекомых и животных из других экотопов. В микробиомах беспозвоночных обнаружены микроорганизмы, характерные для воды и донных отложений оз. Байкал.

Исследовано разнообразие микробных сообществ на створках раковины эндемичных остракод *Candona* sp. (Candonidae) и поверхности байкальских амфипод, несущих эпибиотических инфузорий рода *Lagenophrys* (Ciliophora: Lagenophryidae). В непосредственной близости к лорике инфузорий обнаружены бактериальные биопленки, состоящие из двух морфологически различающихся типов клеток. Участки обрастания микроорганизмами имели в своем составе минеральное вещество, основными элементами которого являлись Fe, S и P. В микробиоме остракод детектированы такие бактериальные таксоны как *Actinobacteriota*, *Gracilibacteria*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, из которых два последних являлись доминирующими. Впервые в микробиоме байкальских остракод были показаны как эпибиотические бактерии рода *Thiothrix*, так и эндосимбиотические родов *Rickettsia* и *Ca. Cardinium*.

Исследования выполнены при поддержке Государственного задания № 0279-2021-0006.

УДК 57.579.579.2

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ДОННЫХ ОСАДКОВ В ЗОНЕ ФЛЮИДНЫХ ПОТОКОВ МЕТАНОВОГО СИПА КРАСНЫЙ ЯР (ЮЖНЫЙ БАЙКАЛ)

**О. В. Шубенкова, А. В. Ломакина, Т. В. Погодаева, Ю. С. Букин,
С. В. Букин, П. М. Колесников, Т. И. Земская**

*Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
olya@lin.irk.ru*

The taxonomic structure of the microbial community of bottom sediments of the methane sipa (Southern Baikal) Krasny Yar has been investigated.

Озеро Байкал – древнейшее и самое глубокое озеро мира, которое располагается в рифтовой зоне, имеет длительную историю развития и многокилометровую толщу осадков (более 9 км) [1], которые вмещают скопления газа, нефти и газовых гидратов. К настоящему времени открыто 54 гидратсодержащих структуры, из них 26 грязевых вулканов, 18 гидратных холмов, 9 сипов и 1 покмарк [2]. Большею частью структуры расположены вдоль зоны разломов, выраженных в рельефе дна или прослеживаемых по геофизическим данным [2].

В зонах разгрузки флюидов происходят сложные геолого-геохимические процессы, которые также оказывают влияние на микробное сообщество, его распределение и таксономический состав в донных осадках. В частности, разогретый минерализованный газонасыщенный флюид, поднимаясь вдоль зоны глубинного разлома к поверхности дна, запускает механизм приповерхностной циркуляции придонных вод в 1,5 м слое осадков.

Целью нашей работы стало исследование таксономической структуры микробного сообщества в зоне существования особого механизма формирования флюидопотоков метанового сипа Красный Яр, расположенного в северо-восточной части южного бассейна оз. Байкал, на западном склоне дельты р. Селенги.

Серия проб донных осадков в районе метанового сипа была отобрана с помощью гравитационных труб в июле 2016 (St7GC1_16, St7GC2_16) и 2021 г. (St5GC2_21, St5GC3_21) с борта НИС “Г. Ю. Верещагин”. Керны 2016 г. характеризовались восстановленными условиями с самой поверхности и представлены темно-серой песчанистой алевролитистой глиной с многочисленными вспучиваниями, трещинами дегазации, газовыми каналами фильтрации и наличием ГГ (газовых гидратов). В керне St7GC1_16 наблюдались каналы с четко различимым более светлым цветом. В керне St7GC2_16 среди восстановленного вмещающего осадка присутствовал вертикальный рыжий окисленный канал (диаметр 1 см) длиной 45 см. Химический состав поровых вод канала показал, что глубинные слои осадка содержат богатые кислородом придонные воды озера и концентрации сульфатов не характерные для поровых вод восстановленных отложений. Содержание остальных анионов и катионов поровых вод канала также соответствовало составу придонной воды озера. Бактериальное сообщество данных кернов было представлено 11 филумами. *Chloroflexota*, *Caldatibacteriota*, *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Acidobacteriota*, *Nitrospirota*,

Desulfobacterota, Sva0485, *Patescibacteria*, *Caldisericota*, *Elusimicrobiota*. Значимую долю (12–51 %) составляли 6 филумов *Chloroflexota*, *Caldatribacteriota*, *Actinobacteriota*, *Acidobacteriota*, *Nitrospirota* и *Proteobacteria*. Бактерии филума *Chloroflexota* доминировали во всех слоях осадка (до 51 %), эта группа микроорганизмов является органотрофами широкого спектра и представлена классами *Dehalococcoidia* и *Anaerolineae*, наиболее часто встречающихся в осадках оз. Байкал, а также неклассифицированными группами JG30-KF-CM66, SHA-26. В обоих кернах в зоне каналов на глубине 50 см и 35–38 см (St7GC1_16, St7GC2_16 соответственно) обнаружены последовательности метанотрофных бактерий семейства *Methylomonadaceae* рода *Methylobacter*, которые осуществляют процесс окисления метана в строго аэробных условиях и не встречаются в глубинных восстановленных слоях осадков со спокойным осадконакоплением. В библиотеке генов 16S рПНК архей сообщества исследуемых кернов выявлены последовательности 9 филумов: *Crenarchaeota*, *Thermoplasmata*, *Halobacterota*, *Nanoarchaeota*, *Hadarchaeota*, *Iainarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Asgardarchaeota*. Наиболее представительными в сообществе были филумы *Crenarchaeota*, *Thermoplasmata*, *Halobacterota* (30–70 %). Большую долю в сообществе архей вносит филум *Crenarchaeota* (до 70 %), который был представлен классами *Nitrososphaeria* и неклассифицированными *Bathyarchaeia*. В поверхностном аэробном слое осадка 0–5 см выявлены последовательности анаэробных архей *Halobacterota* порядка *Methanomicrobiales* и *Methanosarcinales*. Керны, отобранные в 2021 г., имели схожие с кернами 2016 г. геолого-геохимические характеристики и так же вмещали восстановленные и окисленные каналы. Однако в данных кернах на уровне порядков и семейств мы отмечали отличие в распределении и таксономическом составе микробных сообществ, вероятно, это связано с периодичностью флюидной разгрузки сипа.

Таким образом, очевидно, что, движение газонасыщенных глубинных потоков приводит к перераспределению микробного сообщества в зоне этих процессов, в результате чего в поверхностные слои осадка с потоком флюидов выносятся глубинные микроорганизмы, функционирующие только в восстановленных анаэробных условиях и вместе с тем, микробное сообщество поверхностных осадков проникает в анаэробные зоны, все это приводит к тому, что в поверхностные и подповерхностные осадки проникают микроорганизмы с очень древних осадков, среди которых большую долю составляют неклассифицированные археи и бактерии с неизвестным метаболизмом, что может представлять большой научный интерес в расшифровке их метаболического потенциала.

Работа выполнена в рамках гос. задания 0279-2021-0006.

Список литературы

1. Логачев Н. А. История и геодинамика Байкальского рифта // Геология и геофизика. 2003. Т. 44, № 5. С. 391–406.
2. Gas hydrates in Lake Baikal / О. М. Khlystov, А. V. Khabuev, Н. Minami, А. Hachikubo, А. А. Krylov // Limnology and Freshwater Biology. 2018. N 1. С. 66–70. DOI: 10.31951/2658–3518–2018-A-1–66

УДК 575.8

ПЕРВЫЕ СВЕДЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗНООБРАЗИИ МШАНОК КЛАССА PHYLACTOLAEMATA БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА

А. А. Щербакова, Т. Е. Перетолчина

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
serbakovaa62@gmail.com

Representatives of bryozoans of the class Phylactolaemata were studied in the Baikal region. Molecular phylogenetic analysis based on CO1 and ITS1-5.8S-ITS2 sequences allowed us to identify four species of bryozoans: *Plumatella repens*, *P. fungosa* and *P. vaihiria*, *Cristatella mucedo*, *P. vaihiria* was detected in the Baikal region for the first time, and its appearance in this area may be associated with the migration of waterfowl and shorebirds.

Мшанки класса Phylactolaemata являются исключительно пресноводными представителями типа Bryozoa, широко распространены по всему миру, за исключением полярных областей, и населяют лентические и лотические экосистемы, некоторые виды считаются космополитами [2].

Фауна мшанок Байкальского региона изучена слабо, однако М. Кожов с соавторами отмечал присутствие представителей Phylactolaemata в его водоемах [1]. Так, в оз. Байкал и его притоках, в бассейне р. Ангары были отмечены *Plumatella repens* (Linnaeus, 1758), *P. fungosa* (Pallas, 1768), *P. emarginata* Allman, 1844 и *Cristatella mucedo* Cuvier, 1798. При этом никаких молекулярно-генетических исследований филактолемат Байкальского региона до сих пор не проводилось.

Целью нашего исследования было изучение таксономического состава и установление филогенетических взаимоотношений разных видов мшанок, обитающих в оз. Байкал и примыкающих к нему водоемах с другими видами Phylactolaemata на основе фрагментов генов COI мтДНК и ITS1-5.8S-ITS2 яДНК.

Материал был собран во время летних экспедиций 2021–2022 гг. на глубине 0,5–1,5 м с затопленной древесины или высшей водной растительности (Б. Голоустное, оз. Арангатй, р. Томпуда, оз. Бургунду, оз. Кедровое, оз. Кузьминское). Образцы фиксировали 70 % спиртом для последующего молекулярного анализа. ДНК экстрагировали по модифицированному методу Дойла и Диксон и амплифицировали с помощью универсальных праймеров. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе «НАНОФОР 05» в ЦКП ЛИИ СО РАН. Полученные электрофореграммы анализировали в программе BioEdit [4]. Внутривидовые и межвидовые генетические дистанции анализировали, используя программу Mega v.6. Филогенетический анализ проводили с помощью веб-версии программы IQ-TREE v.1.6.8, доступной по ссылке: <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>.

Все собранные образцы по внешнему виду зооидов были отнесены к двум родам: *Plumatella* и *Cristatella*. Для всех собранных образцов были получены препараты ДНК.

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI получены для 13 образцов, а ITS1-5.8S-ITS2 – для 9 образцов ДНК мшанок. Внутривидовые дистанции представителей *Plumatella* и *Cristatella*, собранных в Байкальском регионе и привлеченными из базы данных GenBank не превышали 0–0,5 % по обоим маркерам и укладывались в пределы внутривидового генетического полиморфизма, обнаруженного для этих видов, что позволило идентифицировать собранные образцы как *P. repens*, *P. vaihirieae*, *P. fungosa* и *C. mucedo*.

На филогенетических деревьях, построенных по фрагментам генов COI мтДНК и ITS1-5.8S-ITS2 яДНК мшанки, собранные в водоемах Байкальского региона кластеризуются с европейскими представителями Phylactolaemata. На филогенетическом дереве по COI исследуемые мшанки кластеризуются с *P. repens* и *C. Mucedo* (рис. 1), на дереве по ITS1-5.8S-ITS2 исследуемые мшанки кластеризуются с европейскими представителями *P. repens*, *P. vaihirieae* и *P. fungosa* (рис. 1).

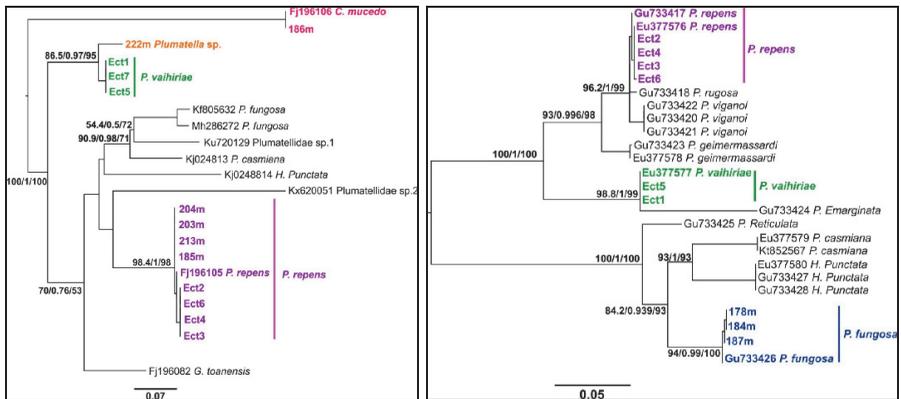


Рис. 1. Слева – филогенетическое дерево, построенное по фрагменту COI мтДНК; Справа – филогенетическое дерево по фрагменту ITS1-5.8S-ITS2 яДНК

Таким образом, в Байкальском регионе фауна мшанок, принадлежащих классу Phylactolaemata представлена типичными обитателями пресноводных водоемов северных широт. Молекулярно-генетический анализ мшанок из исследованных водоемов Прибайкалья позволил однозначно выделить четыре вида: *P. repens*, *P. vaihirieae*, *P. fungosa* (сем. Plumatellidae) и *C. mucedo* (сем. Cristatellidae). В зоне оз. Байкал встречались только представители *P. fungosa*.

Региональная фауна мшанок пополнилась видом *P. vaihirieae*, распространенной в пресных водоемах Северной Америки (США), Италии, Гавайях, Таиланда и Австралии. Находка *P. vaihirieae* в Прибайкалье свидетельствует о расширении географических границ ареала этих мшанок. Так как данный вид был

впервые найден на данной территории, можем предположить, что он был занесен случайно, с перелетными птицами. Сопоставив ареалы обитания *P. vaihiriaae*, с путями миграции Прибайкальских водоплавающих и околоводных птиц, выяснили что через Таиланд и окрестности проходит Восточно-Азиатский внутриконтинентальный миграционный коридор. Здесь могут находиться зимовки уток (шилохвость, широконоска, свиязь и др.), а также останавливаться в ходе миграции множество видов куликов, летящих в Сибирь и на Дальний восток весной из Австралии, Океании и Индокитая.

Список литературы

1. Бентос юго-восточного побережья озера Байкал / М. М. Кожов [и др.] // Биологическая продуктивность водоёмов Сибири : материалы первого совещ. 6–9 окт. 1966 г. Иркутск. М. : Наука, 1969. – С. 19–37.
2. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T. J. White [et al.] // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Acad. Press, 1990. P. 315–322.

УДК 575.852'1

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ НАКОПЛЕНИЯ НЕСИНОНИМИЧНЫХ ЗАМЕН В БЕЛОК-КОДИРУЮЩИХ УЧАСТКАХ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД

А. В. Юдинцева, Ю. С. Букин

Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
udinceva. a@yandex.ru

This paper assesses the accumulation of synonymous and nonsynonymous 13 mitochondrial protein-coding genes of six species of Baikal amphipod based on dN/dS. It has been established that the Baikal species dN/dS is a little more than Holarctic species. The dN/dS values of the *atp8* gene are the highest.

Амфиподы в Байкале представлены более 350 видами и подвидами. Они населяют практически все экологические ниши озера от уреза до его глубин [1]. Митохондриальный (мт) геном байкальских амфипод представлен 13 белок-кодирующими генами, 2 генами рРНК и 22 генами тРНК. Известно, что мт гены, кодирующие белки электрон-транспортной цепи, являются консервативными. Изменения в последовательностях этих генов вызывают особый интерес поскольку могут являться следствием отбора. Проведенные ранее биоинформатические работы обнаружили большое количество несинонимичных параллельных замен в транскриптомах 46 видов байкальских амфипод [2], а также были показаны всплески аминокислотных замен в последовательностях белков пяти клад амфипод оз. Байкал [6].

Цель данной работы – оценить накопление синонимичных и несинонимичных замен 13 мт белок-кодирующими генами байкальских амфипод при помощи параметра dN/dS.

Для изучения накопления синонимичных и несинонимичных замен в белок-кодирующих последовательностях митохондриальных генов у разных видов использовались последовательности 13 белок-кодирующих генов: *atp6*, *atp8*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *cytb*, *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6* из митохондриальных геномов шести видов байкальских амфипод: *Acanthogammarus victorii*, *Eulimnogammarus cyaneus*, *Eulimnogammarus verrucosus*, *Eulimnogammarus vittatus*, *Gammarus lacustris*, *Gmelinoidea fasciatus*. Трансляция нуклеотидных последовательностей осуществлялось при помощи EMBOSS Transeq [4]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей было сгенерировано на основе выравнивания аминокислотных последовательностей в программе PAL2NAL [7]. Параметр dN/dS был рассчитан при помощи пакетов seqinr [3] и ape [5] для языка программирования R. Визуализация выполнялась при помощи пакета ggplot2 [8].

В результате было установлено, что все виды имеют примерно одинаковые медианные значения dN/dS по всем мт генам. Незначительно заниженные значения dN/dS выявлены у голарктического вида *Gammarus lacustris* (рис. 1).

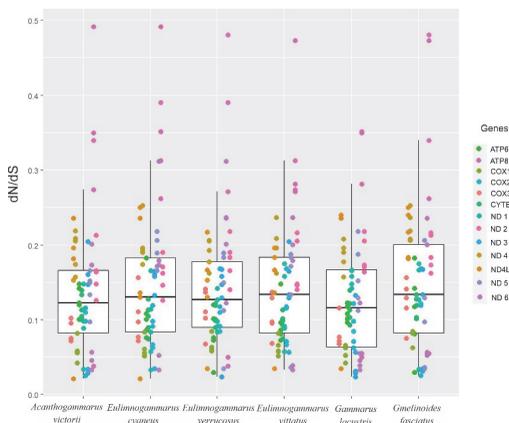


Рис. 1. Распределение показателя dN/dS для 13 митохондриальных белок-кодирующих генов 6 видов байкальских амфипод

Так же установлено, что средние, максимальные и минимальные значения dN/dS по всем мт генам различаются незначительно, за исключением гена *atp8*, где наблюдаются наибольшие значения dN/dS (табл. 1).

Таблица 1

Основные статистические характеристики показателя dN/dS по митохондриальным белок-кодирующим генам

Ген	Статистические характеристики			
	Сред. значения	Макс. значения	Мин. значения	sd
ATP6	0,106	0,182	0,030	0,036
ATP8	0,295	0,492	0,039	0,146
COX1	0,064	0,084	0,043	0,013
COX2	0,101	0,168	0,026	0,037
COX3	0,101	0,157	0,068	0,029
CYTB	0,109	0,140	0,075	0,017
ND1	0,112	0,175	0,033	0,047
ND2	0,175	0,218	0,126	0,028
ND3	0,107	0,204	0,024	0,063
ND4	0,199	0,253	0,158	0,025
ND4L	0,161	0,250	0,021	0,076
ND5	0,145	0,218	0,035	0,055
ND6	0,132	0,312	0,033	0,091

Таким образом было выявлено, что наибольшие изменения в накоплении синонимичных и несинонимичных замен наблюдаются в гене *atp8*. Только у голарктического вида *Gammarus lacustris* наблюдаются более низкие значения параметра dN/dS. Возможно более высокие значения показателя dN/dS у байкальских видов связано с необходимостью адаптироваться к условиям озера, которое претерпевало значительные геологические и климатические изменения в своей истории.

Список литературы

1. Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна : в 2 т. / отв. ред. Тимошкин О. А. Новосибирск : Наука, 2001. Т. 1 : Озеро Байкал, кн 1. 832 с.
2. Burskaia V. et al. Excessive parallelism in protein evolution of Lake Baikal amphipod species flock // *Genome biology and evolution*. 2020. Т. 12, N 9. P. 1493–1503.
3. Charif D., Lobry J. R. SeqinR 1. 0–2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis // *Structural approaches to sequence evolution: Molecules, networks, populations*. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2007. P. 207–232.
4. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022 / Madeira Fábio [et al.] // *Nucleic acids research*. 2022. Vol. 50. W1. W276–W279.
5. Paradis E., Claude J., Strimmer K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language // *Bioinformatics*. 2004. Vol. 20, N 2. P. 289–290.
6. Stolyarova A. V. et al. Bursts of amino acid replacements in protein evolution // *Royal Society Open Science*. 2019. Vol. 6, N 3. P. 181095.
7. Suyama Mikita, Torrents David, Bork Peer. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments // *Nucleic acids research*. 2006. Vol. 34. Suppl. 2. W609–W612.
8. Wickham H., Wickham H. *Data analysis*. Springer International Publ., 2016. P. 189–201.

**ЭКОЛОГИЯ
И РАЦИОНАЛЬНОЕ
ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ**

УДК 57.063.7

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ФИТОПЛАНКТОНА И АССИМИЛЯЦИЯ КРЕМНИЯ ДОМИНИРУЮЩИМИ ВИДАМИ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ В ОЗ. БАЙКАЛ В 2021–2022 ГГ.

**Е. Д. Бедошвили, А. Д. Фирсова, Л. А. Титова, Э. М. Байрамова,
Ю. Р. Захарова, М. В. Сакирко, Е. В. Лихошвай**

*Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия
bedoshvilied@list.ru*

Phytoplankton diatoms in Lake Baikal are the basis of the lake trophic structure and participate in the ecosystem silicon cycle. Diatoms need silicon for cell division and the silica frustule formation; the vital dyes are used to visualize the frustule morphogenesis and to determine the ratio of silicon-utilizing diatoms of different species developing simultaneously. We determined the total abundance, species composition and biomass of phytoplankton in different seasons of Lake Baikal. In laboratory culture staining of forming frustules was tested on the one of the dominant species of the Lake Baikal *Ulnaria acus* at different silicon concentrations. It was shown that the proportion of stained cells depends on the silicon concentration in the medium and in the natural populations does not.

Диатомовые водоросли – важные участники первичной фиксации углерода и круговорота кремния в пресноводных и морских экосистемах. В оз. Байкал диатомовые водоросли являются основными представителями весеннего фитопланктона и образуют осенний пик биомассы фитопланктона. Их главная особенность – кремнеземный панцирь, который эти организмы синтезируют внутри клетки в специализированных органеллах. Панцирь состоит из двух створок и системы кольцевых поясковых ободков. Створки формируются сразу после митоза и цитокинеза, а поясковые ободки – на протяжении всей интерфазы, выделяясь из клетки один за другим и позволяя клетке увеличивать объем панциря и расти.

Для формирования деталей панциря в среде должно присутствовать достаточное количество кремниевой кислоты (доступной для клеток диатомовых водорослей формы кремния). В последнее время для оценки роста диатомовых водорослей и ассимиляции ими кремниевой кислоты из среды применяются различные индикаторные красители (PDMPO, Lysotracker Yellow HCK-123 и др.), способные встраиваться в формирующуюся кремнеземную створку и флуоресцировать при освещении их светом определенной длины волны. Применение прижизненных красителей для визуализации формирующихся деталей панциря позволяет выявить соотношение утилизирующих кремний диатомовых водорослей разных видов, развивающихся одновременно.

Целью нашей работы было изучение особенностей развития фитопланктона оз. Байкал и потребления кремния диатомовыми водорослями как основными продуцентами водоема в разные сезоны и при культивировании.

Лабораторные эксперименты показали, что доля клеток, включающих флуоресцентные красители в формирующиеся панцири *Ulnaria acus* зависит от концентрации кремния в среде; в пределах концентрации от 0 до 1 мг/л происходило увеличение доли окрашенных клеток от 0 до 95±1,7 %.

Наибольших значений численности и биомассы диатомовый фитопланктон в Байкале достигает в весенний гидрологический период (конец мая-июнь); в это время видовой состав фитопланктона в разных котловинах может существенно различаться. Численность и биомасса фитопланктона весной 2021 г. были наиболее обильны в Южной и Средней котловинах, при этом наиболее многочисленным был вид диатомовых водорослей *Stephanodiscus meyeri* Genkal & Popovskaya. Летом и осенью показатели фитопланктона снизились почти в три раза, а доминирующей группой микроводорослей были *Monoraphidium griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová и *Chrysochromulina parva* Lackey. В 2022 г. весной доминировали виды *Ulnaria acus* (Kützing) Aboal и *Fragilaria radians* (Kützing) D. M. Williams & Round, а в июле и в сентябре – *C. parva* и *Cyanodictyon aff. planctonicum* B. A. Mayer, соответственно.

По данным флуоресцентной микроскопии в пробах, полученных в июне 2021 г. и окрашенных PDMPO и Lysotracker Yellow HCK-123 по отработанной ранее методике, на всех исследованных станциях наблюдалось активное формирование панцирей у диатомовых водорослей как из группы доминирующих видов (*S. meyeri*, *Aulacoseira islandica* (O. Müller) Simonsen, *U. acus* и *F. radians*), так и среди минорных видов (в том числе, *Aulacoseira baicalensis* (Wisłouch) Simonsen, *Lindavia baicalensis* (Skvortzov & K. I. Meyer) Nakov, Guillory, M. L. Julius, E. C. Theriot & A. J. Alverson). В этот период согласно полученным результатам, в ассимиляции кремния также как и по биомассе доминировал *S. meyeri*, и доля клеток, формирующих панцирь, на отдельных станциях превышала 70 %. Независимо от сосуществующих одновременно видов доля окрашенных клеток среди других видов также была существенной – например, *Lindavia baicalensis* – 50–69 %. В летний период при низкой общей численности диатомовых водорослей способность клеток вида *L. baicalensis* ассимилировать кремний и формировать панцири сохраняется на высоком уровне – около 70 % клеток вида окрашивается красителями, а у другого весеннего вида *S. meyeri* – падает – только треть клеток включает краситель. В период развития осеннего фитопланктона доминированию среди диатомовых водорослей виду *Lindavia minuta* (Skvortzov) Nakov et al. сопутствует и высокий уровень клеток, ассимилирующих кремний, в то время как появившийся на некоторых станциях весенний вид *A. baicalensis* имеет низкую долю таких активных клеток.

Весной 2022 г. фитопланктон распределен неравномерно и носил смешанный характер. Окраска формирующихся деталей панциря показала небольшие отличия по котловинам в составе наиболее активно ассимилирующих кремний диатомей. Для Южной котловины было характерно наличие на нескольких станциях клеток *A. baicalensis* с окрашенными панцирями. У вида *A. baicalensis* активность к ассимиляции кремния в июне 2022 г. была ниже, чем в июне 2021 г. и не зависела от присутствия в пробе других видов диатомовых водорослей. Основную массу диатомового фитопланктона, формирующего кремнеземные панцири, в Южной и Средней котловине составляли *U. acus* и *F. radians*, а в северной котловине и в Малом Море – *S. meyeri*. Во время

наблюдений за природными популяциями концентрация кремния в среде варьировала в пределах 0,08–0,57 мг/л.

Из наших наблюдений видно, что конкурентного исключения видов диатомовых водорослей при их совместном развитии не происходит при относительно низкой концентрации кремния, при этом в природной популяции не наблюдается зависимости ассимиляции кремния диатомеями разных видов от концентрации кремния в среде, в отличие от лабораторных экспериментов. Предположительно, различия в способности клеток разных видов диатомей ассимилировать кремний связано с разными стадиями их развития в популяции. Дальнейшие исследования с применением прижизненных красителей будут способствовать пониманию механизмов, управляющих структурой и численностью сообществ фитопланктона, что также позволит предположить потенциальные последствия изменений окружающей среды и для биогеохимии и продукции более высокого трофического уровня.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 121032300186-9.

УДК 581.5

ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА УРОВЕНЬ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ УРБАНИЗИРОВАННОЙ ТЕРРИТОРИИ ЧИТЫ

Г. М. Гамзатов, А. А. Тороян, Д. Б. Дашидондокова

Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия
gamzat_gamzatov_2002@mail.ru

In the course of studying the magnitude of oxidative stress in the leaves of perennial plants in the conditions of the city of Chita, it was revealed that the values of the parameter varied over a wide range. The maximum concentrations of free radicals were noted in the central part of the city, in *Artemisia vulgaris* and in the leaves of *Plantago major*. In areas with a low intensity of technogenic impact, the level of oxidative stress was an order of magnitude lower.

Актуальность. Загрязнение окружающей среды может отрицательно повлиять на экосистемы. Актуальным вопросом является определение уровня окислительного стресса у растений в ответ на негативные техногенные воздействия.

Цель. Выявить наиболее загрязненные районы г. Читы на основе данных по уровню развития окислительного стресса в растениях.

Материалы и методы. Материалами исследования были следующие виды растений: *Taraxacum officinale*, *Elymus dahuricus*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago major*, собранные в июне 2021 г. На следующих площадках города: парк ОДORA, площадь Декабристов, ЧГМА, 1-й микрорайон. Величину окислительного стресса определяли по уровню образования малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой фотометрическим методом при 532 и 600 нм на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ. Расчёт концентрации МДА выполняли по формуле: $C_x = \frac{(E_{532} - E_{600}) \cdot V_c \cdot 2}{k \cdot m_s \cdot V_a}$, где E – оптическая плотность, V_c и V_a – объемы общего экстракта и экстракта для анализа (мл), k – коэффициент молярной экстинкции ($156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), m_s – масса образца, г [1].

Результаты и их обсуждение. Выявлено, что в разных районах Читы интенсивность окислительного стресса в растениях имела существенные различия. Наиболее интенсивным окислительный стресс был отмечен в корнях полыни (0,142 мМ/г сырого веса) и в листьях подорожника (0,123 мМ/г сырого веса) (ЧГМА), пределы изменения показателя составляли от 0,0045 до 0,142 мМ/г. Наименьшую величину показатель имел в корнях одуванчика (0,009 мМ/г сырого веса) и подорожника (0,004 мМ/г сырого веса) (площадь Декабристов). В целом практически для всех видов в условиях площади Декабристов величина окислительного стресса характеризовалась низкими значениями (0,006–0,024 мМ/г сырого веса). Немного большие показатели фиксировались в парке ОДORA (0,006–0,036 мМ/г сырого веса) и в 1-м микрорайоне (0,006–0,029 мМ/г сырого веса).

Вывод. Выявлено, что площадка возле ЧГМА характеризовалась максимальными величинами развития окислительного стресса у растений, в связи с высоким уровнем загрязнения атмосферы. Этот участок расположен возле крупных автодорог в центральной части города. Анализ развития окислительного стресса в разных частях растений показал, что максимум отмечен в корнях полыни, а минимум в корнях подорожника, что может быть обусловлено высокой активности ферментов антирадикальной защиты.

Научный руководитель: доцент кафедры химии и биохимии, к. б. н., доцент Бондаревич Е. А.

Список литературы

1. Методы оценки антиоксидантного статуса растений : учеб.-метод. пособие / Г. Г. Борисова [и др.] ; отв. ред. Н. В. Чукина. Екатеринбург : Изд-во Урал, ун-та, 2012. С 20–22.

УДК 574.23:574.24:595.3

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БАЙКАЛЬСКИХ СИГОВЫХ РЫБ В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ

О. Ю. Глызина¹, Ю. П. Сапожникова¹, В. М. Яхненко¹, М. Л. Тягун¹,
Т. Н. Аvezова¹, Л. А. Глызин¹, А. А. Кармаданова¹, А. Г. Королева¹,
А. А. Волкова¹, Е. А. Оборина², С. Н. Адамович², Л. В. Суханова¹

¹Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

²Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Россия

Для получения быстрорастущих, стрессоустойчивых и экологически чистых аквакультур рыб использовали комплекс технологий (мини-УЗВ, стимуляция развития, контроль среды). Половые продукты рыб, выловленных в оз. Байкал, транспортировали на базу уникальной научной установки «Экспериментальный пресноводный аквариумный комплекс байкальских гидробионтов» ЛИИ СО РАН (ПАК). Путем искусственного оплодотворения, с использованием нативных и криоконсервированных половых продуктов, получали чистые линии и гибридные формы рыб (F1, F2, беккроссы).

На базе ПАК проводили экспериментальные работы с использованием рыб, находящихся на всех стадиях онтогенеза рыб. При этом соблюдали все условия, необходимые для нормального развития икры и обеспечивали дополнительные преимущества, позволяющие облегчить уход и упростить контроль за процессом без ущерба для выживаемости эмбрионов. Использование «протатранов» – стимуляторов развития – позволило устранить неблагоприятные факторы (например, развитие сапролегнии и/или неблагоприятной микрофлоры, ведущих к гибели всей партии) при инкубации небольших количеств икры; увеличить скорость выклева (сократить время инкубации) и выживаемость эмбрионов рыб; повысить иммунитет эмбрионов.

Термоадаптационные механизмы оценивали по содержанию липидов, особенно полиненасыщенных жирных кислот, как важных показателей качества аквакультур. В условиях ПАК проведены исследования липидов тканей белых мышц искусственно полученных неполовозрелых байкальских сига *Coregonus baicalensis* Dyb., омуля *C. migratorius* Georgi и их гибридов F1 (+ омуль × > озёрный сиг), содержащихся при разных температурах в байкальской и водопроводной воде. Обнаружены и идентифицированы 56 компонентов разной химической природы (жирные кислоты, альдегиды, стерины). Выявлена зависимость жирнокислотного состава мышечных тканей сиговых рыб от температурного фактора. В пуле жирных кислот всех образцов тканей сиговых, обитающих в байкальской воде при температуре +4 °С преобладают незаменимые ПНЖК, в том числе 20:5n3 и 22:6n3. При содержании рыб при температуре +10 °С возросло количество мононенасыщенных кислот (МНЖК) в 1,5–2 раза. Уровень липидных компонентов в исследованном корме можно охарактеризовать как достаточный для нормального роста и развития

рыб. Выявлено качественно одинаковое содержание общих липидов во всех исследованных группах рыб, при этом уровень триацилглицериннов значительно преобладал в мышцах беккрасса-сига, по сравнению с беккроссом-омулем и гибридом F1.

Кроме того, данная работа посвящена исследованию температурной преадаптации молоди сиговых рыб, которая связана с феноменом «гормезиса», являющегося количественной мерой биологической пластичности, при которой низкие/сублетальные дозы стрессора являются стимулирующими. В частности, установлено, что предварительный тепловой шок (фактор преадаптации, или прекондиционирования) повышает устойчивость молоди пыжьяна *C. pidschian* Gmelin, пеляди *C. peled* Gmelin, байкальского сига, байкальского омуля и их гибридов F1 к последующей термической нагрузке в процессе онтогенеза. Реакция на фактор прекондиционирования является комплексной, включающей изменения биохимических и физиологических процессов, тем не менее, наиболее показательными являются клеточные и молекулярные механизмы ответа на стресс: активность теломеразы, относительная длина теломер, экспрессия определенного набора генов, уровень функционально-активных митохондрий, а также лейкоцитарный «профиль» окислительного стресса. Выбранные биомаркеры имеют тканевую специфичность и рассматриваются в периферической крови, несущей адекватную информацию об окислительном статусе; жабрах, респираторной поверхности, накапливающей высокие концентрации активных форм кислорода; селезенке и почках, органах кроветворения и иммунного ответа; печени, основном органе, отвечающем за метаболизм, а также сердце, референсном органе, с работой которого связана жизнедеятельность всего организма.

Интеграция всех полученных данных вносит большой вклад в наше понимание биологии сложных признаков и пластичности диких и аквакультурных форм сиговых видов рыб. Отслеживание горметических эффектов важно также в широком контексте понимания общих механизмов адаптируемости к новой среде обитания интродуцируемых форм. Результаты помогут выяснить связь между благополучием и дальнейшим эволюционным успехом видов в естественной среде.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и МОКНМС в рамках научного проекта № 20-54-44017 (изучение стимуляторов роста), в рамках проекта РНФ № 23-24-00644 (<https://rscf.ru/project/23-24-00644/>) (исследование термоадаптационных механизмов) и госзадания ЛИН СО РАН 0279-2021-0005 (121032300224-8) (получение аквакультуры сиговых рыб).

УДК 57.042

МОДИФИКАЦИЯ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ РАСТЕНИЙ КАК МЕХАНИЗМ ИЗМЕНЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕССОРАМ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ

**М. А. Гринберг, А. В. Иванова, Ю. А. Немцова, П. А. Пирогова,
Н. В. Ильин, Е. А. Мареев, В. А. Воденев**

*Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород, Россия
mag1355@yandex.ru*

Chronic exposure to ionizing radiation or magnetic field does not significantly affect the state of plants at rest, but changes their resistance to drought stress. The effect may be based on the modification of signaling systems.

В природе растения могут испытывать воздействие различных факторов окружающей среды. Неблагоприятные условия, зачастую, формируются в результате комбинации таких воздействий различной природы с различными временными паттернами (кратковременные «острые» стрессоры накладываются на длительные «хронические» факторы). Низкая интенсивность хронических факторов может обуславливать незначительность эффектов на традиционно регистрируемые в экспериментах морфометрические, физиологические и биохимические показатели. При этом такие низкоинтенсивные хронические факторы могут модифицировать характер реакции растений на «острые» стрессоры. Можно предположить, что в основе такой модификации лежит изменение статуса сигнальных систем растений. Вызываемые стрессорами сигналы способствуют координации ответов на уровне целого организма и повышают уровень устойчивости к неблагоприятным условиям в целом. Система стрессового сигналинга обладает высокой чувствительностью к различным стимулам среды, что обеспечивает возможность тонкой подстройки состояния растений к окружающим условиям. Высокая чувствительность и восприимчивость к стимулам различной природы делает систему стрессовой сигнализации перспективной мишенью для изучения механизмов влияния комбинированного действия факторов. Одним из значимых типов стрессовых сигналов, возникающих в ответ на разнообразные «острые» стрессоры, являются электрические сигналы. Они представляют собой распространяющуюся с высокой скоростью волну деполяризации клеток. Известно, что вызываемые такими сигналами функциональные ответы способствуют повышению жизнеспособности растений в неблагоприятных условиях. Целью настоящей работы являлось изучение модифицирующего влияния низкоинтенсивных факторов среды на развитие устойчивости растений к засухе и выявление роли электрических сигналов в этом процессе. В качестве низкоинтенсивных хронических факторов нашей работе рассматривались повышенные уровни ионизирующего излучения (ИИ) и переменного магнитного

поля (МП). Эти факторы в настоящее время представляют значительный интерес для изучения с точки зрения эволюционной и космической биологии, а также вопросов антропогенного загрязнения окружающей среды.

Исследования проводились на проростках пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). В качестве хронического воздействия в экспериментах использовалось низкоинтенсивное воздействие ИИ и МП. Повышенные уровни ИИ задавались при помощи источника β -излучения на основе солей ^{90}Sr - ^{90}Yc активностью 0,1 МБк и мощностью дозы примерно 31,3 мкГр/час. Облучение началось с момента замачивания семян и продолжалось на протяжении всего периода выращивания растений. Магнитные поля задавались катушками Гельмгольца. Частота поля составляла 14,3 Гц, магнитуда составляла 18 мкТл. Растения подвергались действию поля с момента замачивания семян и далее на протяжении всего периода выращивания растений. В качестве кратковременного стрессора, развивающегося на фоне повышенного уровня ИИ или МП, рассматривалась засуха. Засуха задавалась прекращением полива начиная с 14-го дня выращивания растений.

Состояние растений оценивалось на основе морфометрических показателей, интенсивности фотосинтеза и уровня транспирации. Показатели флуоресценции хлорофилла, отражающие активность световой стадии фотосинтеза, регистрировались при помощи PAM-флуориметра PlantExplorerPro⁺ (PhenoVation, Нидерланды). Для измерения уровня ассимиляции CO₂ использовался инфракрасный газоанализатор GFS-3000 с измерительной головкой Dual-PAM gas-exchange Cuvette 3010-Dual (Heinz Walz GmbH, Германия). Транспирация оценивалась по температуре листьев при помощи тепловизора Testo 885 (Testo, Германия).

В качестве одного из потенциальных механизмов влияния хронического воздействия на устойчивость растений к стресс-факторам рассматривалась модификация стрессовых сигналов, в частности, параметры дистанционных электрических сигналов и статус электрогенеза в целом. Электрические реакции регистрировались внеклеточно при помощи стеклянных макроэлектродов. В качестве модельного стимула, вызывающего распространение электрических сигналов, использовалось локальное повышение температуры – нагрев кончика листа в кювете с водой.

В эксперименте показано, что ИИ с низкой мощностью дозы не оказывает значительного влияния на морфометрические показатели и активность фотосинтеза у растений пшеницы в отсутствие дополнительных стрессоров (в состоянии покоя). Обнаружено, однако, что облучение существенно влияет на устойчивость растений к засухе. На растениях, выращенных в условиях повышенного радиационного фона, показано более быстрое и сильное подавление фотосинтетических показателей после прекращения полива по сравнению с необлучённым контролем. В случае, если наступлению засухи предшествовал индуцированный модельным стимулом дистанционный стрессовый электрический сигнал, устойчивость к засухе у облучённых растений существенно повышалась. Выявлено, что протекторный эффект электрических сигналов в отно-

шении засухи у облучённых растений выше, чем аналогичный эффект у растений, выращенных при естественном уровне радиационного фона. Это может объясняться вызванным ИИ усилением электрических сигналов и вызываемых ими функциональных ответов, что было показано в наших экспериментах.

Для растений, подвергнутых действию повышенного уровня МП, также не выявлено существенных отличий от контроля по морфометрическим и фотосинтетическим показателям в состоянии покоя. Показано, что низкоинтенсивное МП с частотой 14,3 Гц способствует повышению устойчивости растений пшенице к засухе, несколько увеличивая время сохранения фотосинтетических показателей на уровне контрольных значений. В основе такого эффекта может лежать модификация сигнальных систем, включая процессы электрогенеза, для которых в работе показано вызванное МП повышение активности.

Таким образом, модификация сигнальных систем под действием различных низкоинтенсивных хронических факторов может являться значимым аспектом формирования устойчивости растений к стрессовым условиям.

Работа выполнена в рамках проекта Национального центра физики и математики (НЦФМ) «Экспериментальная лабораторная астрофизика и геофизика».

УДК 631.4:550.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНДЕКСОВ ВЫВЕТРИВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКОЛОГО-ГЕОХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ДЕРНОВО-ПОДБУРОВ В РАЙОНЕ С. БОЛЬШИЕ КОТЫ

Н. А. Жученко¹, Н. А. Мартынова²

¹ *Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия*

² *Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия*
zhna@lin.irk.ru

The soddy podburs were investigated. The elemental composition of soils was analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry. The geochemical weathering indices were calculated.

Почвенный покров для наземных экосистем выполняет, с одной стороны, роль буферного слоя, удерживая в себе выпадающие из атмосферы загрязнители (тяжёлые металлы, радионуклиды и др.), а с другой стороны, трансформирует и вовлекает в экосистему новые компоненты, разрушая почвообразующие породы, меняя устойчивые формы микроэлементов на токсичные подвижные. Наиболее важными с точки зрения геохимических преобразований почв являются кислотно-основные характеристики почвенного раствора, контролирующие миграционную способность большинства химических элементов.

Район с. Большие Коты, расположенный на западном берегу южной котловины оз. Байкал, с начала XX в. является экспериментальной базой лимнологических исследований самого старого, самого глубокого и пресного олиготрофного озёра Евразии. С начала XXI в. проводятся ежегодные (сезонные и в зависимости от метеоусловий) биогеохимические исследования прибрежной и заплесковой зоны бухты Большие Коты на базе стационара Лимнологического института СО РАН. Зачастую установленные уровни и скорости эвтрофикации урезовой зоны, повышение содержания тяжёлых металлов в интерстициальных и урезковых водах данной бухты объясняются стоком поверхностных (ливневых, талых снеговых) и грунтовых вод, насыщенных продуктами выветривания горных пород, разрушением почвенного покрова и минерализацией растительного опада лесов, а также стоком антропогенно-образованных водных сбросов из выгребных ям или септиков посредством фильтрации через грунт.

По геоморфологическому районированию район с. Большие Коты относится к таёжным Байкало-Джугджурской и Южно-Сибирской областям с горными субарктическими гольцовыми горно-таежными ландшафтами со светлохвойной растительностью и глубоко расчленённым эрозионным рельефом (Галазий, 1993). Почвообразующие породы представлены элювио-делювиальными и пролювиальными продуктами выветривания кристаллических пород, которые характеризуются маломощностью и высокой скелетностью.

Для этой провинции характерны контрастные параметры тепло- и влагообеспеченности, различные типы растительности, неоднородность литологического строения, что делает территорию восточных склонов Приморского хребта

модельной площадкой для исследования устойчивости естественных экосистем с различными ботаническим составом и почвенными условиями к разным типам антропогенного влияния. В почвенном покрове днищ падей преобладают дерново-подбуры. Почвы относятся к слабокислым вдоль склонов западной экспозиции и к кислым вдоль склонов восточной экспозиции. Промывной режим почвенных профилей и кислая реакция почвенного раствора способствуют значимой миграции большинства химических элементов с радиальным стоком из почв. Присутствие обменного алюминия в почвенном поглощающем комплексе свидетельствует о повышении увлажненности и снижении тепла подножий склонов восточной экспозиции по сравнению со склонами западной экспозиции и может являться маркером геохимической обстановки с более эффективным кислотным выветриванием почв в масштабе нескольких сотен метров (Zhuchenko, Martynova, 2020).

Почвы исследуемого района пос. Большие Коты относятся к отряду альфегумусовых почв, типу дерново-подбуров, подтипу иллювиально-железистых дерново-подбуров. Формула почвенного профиля – (O)-AY-(BFhi)-BF1-(hh)-BF2-C. Дерновый горизонт O мощностью 3–5 см встречается под развитой травянистой растительностью с проективным покрытием 100 %. Переходный от гумусового к иллювиальному горизонт BFhi выделяется в отдельный горизонт в тех случаях, когда в полевых условиях визуально диагностируются языковатые гумусовые потёки сероватого цвета. В ряде почвенных профилей выделен погребённый гумусовый горизонт разного генезиса: от затёка верхнего гумусового горизонта в разрезе ВК 1–2013 до погребённых ориентировочно в результате схода селевых потоков дневных поверхностей в разрезах ВК 3–2013 и ВК 4–2013. Горизонт BF1 отличается от нижележащего BF2 более яркими оттенками бурого цвета и меньшей плотностью.

Химические анализы почвы выполнены в лаборатории гидрохимии и химии атмосферы в соответствии с методическими указаниями (Technical Manual for Soil..., 2000). Определение макро- и микроэлементного состава в лаборатории гидрохимии и химии атмосферы в соответствии с методическими указаниями (ПНД Ф 16.1:2.3:3.11-98). ИСП-МС анализ выполнен в ЦКП «Ультрамикроанализ» ЛИН СО РАН на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500se. Отмечено сходство макроэлементного состава гумусового горизонта AY и погребённого горизонта [hh] в почвенном разрезе ВК 1–2013, что свидетельствует в пользу гипотезы о затёке верхнего гумусового горизонта в результате криогенных явлений. Погребённые гумусовые горизонты [hh] в почвенных разрезах ВК 3–2013 и ВК 4–2013 имеют отличный от современного гумусового горизонта AY макроэлементный состав. В целом макроэлементный состав дерново-подбуров характеризуется относительным увеличением вниз по профилю содержания натрия, калия, магния и титана, незначительным снижением с глубиной содержания марганца, относительно постоянным составом по кальцию и резким накоплением железа в иллювиальном горизонте BF1.

По содержанию макроэлементов рассчитаны следующие геохимические коэффициенты, индексы, модули, отражающие определенные почвенные про-

цессы, степень выветрелости: суммарное валовое содержание $Mg + Ca + K$ (%); молекулярное отношение CaO/MgO ; НКМ – модуль нормированной щелочности: $(Na_2O + K_2O)/Al_2O_3$, ИГ – индекс глиноземистости: $Al_2O_3/(CaO + K_2O + Na_2O)$; ЩМ – щелочной модуль: Na_2O/K_2O , PIA – плагиоклазовый индекс изменения: $[(Al_2O_3 - K_2O)/(Al_2O_3 + CaO + Na_2O - K_2O)] \times 100$; ИВ – интенсивность выветривания $Al_2O_3/(CaO + MgO + Na_2O + K_2O)$.

Список литературы

1. Zhuchenko N. A., Martynova N. A. Environmental and geochemical characteristics of sod podburs near the Bolshiye Koty settlement (Lake Baikal) // *Limnology and Freshwater Biology*. 2020. N 4. P. 903–905. DOI: 10.31951/2658-3518-2020-A-4-903.
2. Байкал (атлас) / ред. Г. И. Галазий. М. : Изд-во Федер. службы геодезии и картографии России, 1993.
3. Technical Manual for Soil and Vegetation Monitoring in East Asia / Adopted at: The Second Interim Scientific Advisory Group Meeting of Acid Deposition Monitoring Network in East Asia, 2000. 166 p.

УДК 579.22

БАКТЕРИИ РОДА *STREPTOMYCES* SP., КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЕСТРУКТОРЫ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

**Н. А. Имидоева, Е. В. Малыгина, М. Е. Дмитриева, А. Ю. Бельшенко,
В. Н. Шелковникова, Д. В. Аксёнов-Грибанов**

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
natasha-imideva@rambler.ru*

This study shows that the isolated actinobacterial strains are capable of growing on raw materials containing hard-to-degrade components. It has been found that strains are able to degrade such raw materials and at the same time produce biologically active compounds. These compounds can be used in the disposal of industrial wastes.

Микроорганизмы, колонизирующие труднодеградируемые субстраты, представляют огромный интерес для науки и техники. Известно, что бактерии, осуществляющие процессы деструкции, обладают адаптированным метаболизмом и способны к синтезу биологически активных соединений.

Целью работы было выделение чистых культур бактерий-деструкторов, населяющих образцы гидролизного лигнина и оценка их биотехнологического потенциала. Пробы гидролизного лигнина собраны на территории Байкальского целлюлозно-бумажного комбината. Образцы посеяны газомом на различные по составу питательные среды: NL19, NL19 с 10 % лигноцеллюлозой, минимальная питательная среда MM, MM с 10 % лигноцеллюлозой, полифепан, сухая лигноцеллюлоза. Идентификацию штаммов проводили посредством амплификации гена 16S рРНК. Последовательности 50 штаммов были идентифицированы как бактерии, принадлежащие роду *Streptomyces* sp.

В ходе дальнейшей работы проведен анализ способности штаммов *Streptomyces* sp. к росту на средах, содержащих гидролизный лигнин. Показано, что не менее половины выделенных штаммов способны к росту на сухой лигноцеллюлозе и не способны к росту на полифепане. Наличие антибиотической активности проводили с применением диско-диффузионного метода. Наиболее эффективными оказались такие питательные среды для синтеза антимикробных веществ, как NL19 и MM. Вместе с тем слабую ингибирующую активность отмечали для экстрактов штаммов *Streptomyces*, культивируемых на лигнинсодержащей питательной среде. Примечательно, что рост таких тест-культур, как *P. putida* и *S. cerevisiae* подавлялся большим числом штаммов, культивируемых на лигнинсодержащем сырье.

Оценка биотехнологического потенциала проведена с помощью подходов хроматографии и хромато-масс-спектрометрии низкого разрешения. Установлено, что штамм *Streptomyces* sp. LPB22-31A синтезирует не менее 14 низкомолекулярных природных соединений при культивировании на гидролизном лигнине.

Таким образом, в ходе данной работы показано, что выделенные в ходе исследования штаммы способны проводить деструкцию лигнин-содержащих субстратов. При этом они способны синтезировать биологически активные метаболиты. Дальнейшее изучение данных соединений обладает не только научной, но и практической значимостью, способствуя развитию технологий утилизации отходов промышленных производств.

Работа поддержана грантом Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно-образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, МНОЦ Байкал).

УДК 574.24

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ХВОЕ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ НА ТЕРРИТОРИИ С ЖЕСТКИМИ ПРИРОДНЫМИ УСЛОВИЯМИ И ХРОНИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

О. В. Калугина¹, Л. В. Афанасьева²

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия

²Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ, Россия
olignat32@inbox.ru

The total content of ascorbic acid (AA) and its forms in the needles of *Larix sibirica* was studied at different levels of pollution by emissions from the Bratsk aluminum smelter. Its active participation in metabolic processes in coniferous trees is shown at low, medium and high levels of pollution. With critical pollution, the ascorbate pool is depleted and the role of AA as an antioxidant decreases.

Иркутская область – богатейшая кладовая «зеленого золота», здесь произрастает 11,5 % лесов всей России. По породному составу преобладают хвойные леса, где видами-доминантами являются лиственница сибирская (40 %) и сосна обыкновенная (34 %). Их состояние зависит от целого ряда стрессовых факторов, включая хроническое воздействие техногенного загрязнения, которое усиливается жесткими природными условиями. Если в южной части области среднегодовая температура воздуха равна $-1,9^{\circ}\text{C}$, а продолжительность безморозного периода – 118 дней, то в северной части эти показатели составляют, соответственно, $-4,2^{\circ}\text{C}$ и 90 дней. Наши исследования проводились на 29 пробных площадях (ПП), заложенных в хвойных лесах севера региона на удалении до 80 км от Братского алюминиевого завода (БрАЗ) – крупнейшего в стране предприятия по производству алюминия, поставляющего в атмосферу ежегодно 76 тыс. тонн загрязняющих веществ [1]. Наиболее токсичными компонентами эмиссий завода являются фторсодержащие соединения, диоксид серы, оксид углерода, окислы азота, твердый аэрозоль, в составе которого велика доля тяжелых металлов, а также ПАУ. Зонирование обследованной территории по уровню техногенного загрязнения осуществлялось по результатам кластерного анализа данных о содержании поллютантов в хвое лиственницы – основной лесобразующей породы – на всех ПП, при этом рассчитывались коэффициенты концентрации элементов и индекс биогеохимической трансформации элементного состава хвои. Были выделены древостой слабого, среднего, сильного и критического уровней загрязнения. Слабый уровень загрязнения древостоев выявлен на ПП, расположенных на расстоянии 21–50 км от БрАЗа по разным направлениям, средний – на расстоянии 6–20 км, сильный – на расстоянии 1–5 км в западном, северном, северо-западном и северо-восточном направлениях, а также на ветроударных склонах хребтов, критический уровень техногенной нагрузки выявляется на удалении до 1 км, где найдены единичные деревья. Древостои на ПП, расположенных на расстоянии более 50 от БрАЗа, характеризуются самыми низкими (фоновыми) концентрациями элементов в хвое.

Таблица

Содержание аскорбиновой кислоты и ее форм в хвое лиственницы при разном уровне загрязнения, мг/г сырой массы

Уровень техногенного загрязнения	Общее содержание АК*	ДКГК	ДАК	АК _{восст.}
Фоновый	0,238±0,008	0,087±0,004	0,114±0,006	0,037±0,001
Слабый	0,242±0,010	0,103±0,008	0,082±0,003	0,057±0,004
Средний	0,270±0,009	0,110±0,007	0,054±0,001	0,106±0,006
Сильный	0,259±0,008	0,142±0,009	0,008±0,002	0,109±0,008
Критический	0,219±0,011	0,133±0,010	0,005±0,001	0,081±0,002

*АК – аскорбиновая кислота, ДКГК – дикетогулоновая кислота, ДАК – дегидроаскорбиновая кислота, АК_{восст.} – восстановленная форма АК

Было показано, что техногенные поллютанты инициируют развитие в растительном организме окислительного стресса, при котором образуется избыточное количество АФК. Показано, что концентрация H₂O₂ увеличивается с ростом уровня загрязнения хвои: при слабом загрязнении она превышает фоновое значение (12,18 мМоль/г сырой массы) в 1,3 раза, при среднем – в 1,8 раза, при сильном – в 2,3 раза, при критическом – в 4,5 раза. В то же время количество H₂O₂ зависит не только от интенсивности процессов ее генерации в клеточных компартментах, но и от эффективности работы антиоксидантной системы, в том числе уровня аскорбиновой кислоты (АК). По данным исследователей, именно АК относится к соединениям первой линии защиты [3]. Выявлено, что общее содержание АК в хвое лиственницы на фоновых и загрязненных ПП достоверно не различается. Можно говорить лишь о тенденции к ее увеличению в хвое деревьев при слабом, среднем и сильном уровнях загрязнения, и к снижению при критическом уровне (таблица). Гораздо сильнее в хвое загрязненных деревьев изменяется содержание отдельных форм АК. Так, по мере усиления техногенного загрязнения, от слабого до сильного уровня, в хвое возрастает содержание дикетогулоновой кислоты (ДКГК) в 1,2–1,6 раза и АК_{восст.} – в 1,5–2,9 раза по сравнению с фоновым содержанием. Параллельно снижается уровень окисленной формы (ДАК), при слабом и среднем загрязнении он становится ниже фоновых показателей в 1,4–2,1 раза, при сильном уровне – концентрация ДАК в хвое снижается в 14 раз. При критическом уровне загрязнения содержание ДАК в хвое достигает минимальных значений, также отмечается и некоторое снижение концентрации АК_{восст.}, что в результате сказывается и на более низком уровне общего содержания АК.

При рассмотрении соотношения разных форм АК выявлено, что в хвое деревьев на фоновых ПП в пуле АК преобладает окисленная форма, сумма дериватов (ДАК+ДКГК) составляет 80–85 % от общего содержания АК, на восстановленную форму приходится лишь 15–20 % (рис.). В хвое загрязненных деревьев, уменьшается уровень ДАК при одновременном возрастании количества ДКГК, при этом сумма дериватов остается на более низком уровне, чем в хвое фоновых древостоев. Можно предположить, что при загрязнении восстановленная форма используется более активно.

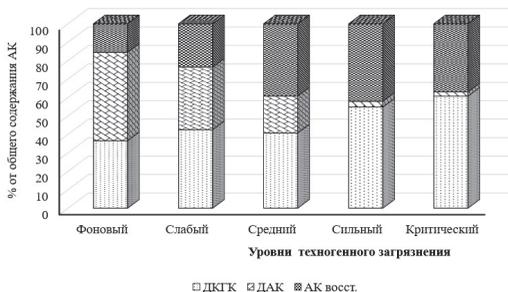


Рис. Процентное соотношение разных форм аскорбиновой кислоты в хвое лиственницы при разном уровне загрязнения.

В целом полученные результаты свидетельствуют, что в хвое загрязняемых деревьев одновременно идут процессы синтеза и распада АК. При сильном уровне загрязнения наблюдается наиболее активное использование АК в обменных процессах, сопровождаемое накоплением ДКГК, образующейся в результате необратимого разрушения окисленной формы. Высокий пул ДКГК может быть вызван повышением активности фермента пероксидазы, что свидетельствует о нарушениях в процессах дыхания, об образовании перекисей и сдвигах окислительно-восстановительных реакций. [2]. При критическом уровне загрязнения полученные данные указывают на достоверное истощение аскорбатного пула и снижение роли аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта.

Список литературы

1. Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды в Иркутской области в 2021 году. Ижевск : Принт, 2022.
2. Чупахина Г. Н. Система аскорбиновой кислоты растений.
3. Akram N. A., Shafiq F., Ashraf M. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance // Front. Plant Sci. 2017. N 8. P. 613.

УДК 631.4

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МНОГОМЕРНОЙ СТАТИСТИКИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПОЧВ ЮЖНОГО ПРЕДБАЙКАЛЬЯ

А. А. Козлова, А. А. Приставка

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
allak2008@mail.ru*

The soils of the Southern Predbaikalia were considered from the point of view of a two-piece body with a set of stable properties characterizing the history of soil formation as a bioinert body and a set of dynamic indicators responsible for the functioning of soils in the modern phase of soil formation, using the methods of statistical analysis.

Южное Предбайкалье является частью субконтинента Северной Азии, представляющая собой природный район суббореального пояса, расположенного внутри бореального. Совместное влияние котловинного эффекта и ариднотеневой формы вертикальной зональности обусловило нахождение на ограниченной площади резкоконтрастных ландшафтов: от подтаежных до сухостепных. Диапазон экосистем соответствует разным субконтинентам Азии, взаимопроникновение которых является уникальным ландшафтно-ситуационным примером сибирской природы в пределах Северной Азии [2]. Специфика природных условий исследуемого региона наложили определенный отпечаток на формирование почв, характеризующиеся большим разнообразием. Особенно noteworthy функциональных свойств почв Южного Предбайкалья является микробиологическая деятельность, активность которой составляет очень короткий период (1–1,5 месяца), но при этом интенсивность ее очень высокая, что сказывается на преобразовании органического вещества [1].

Применение методов статистического анализа позволило установить особенности формирования и функционирования различных типов почв Южного Предбайкалья по близости устойчивых свойств и динамических показателей. Метод главных компонент выявил четкие различия в формировании почв различных ландшафтов по устойчивым свойствам (рис. 1).

Главными компонентами в изменении устойчивых свойств почв выступают гранулометрический состав, содержание и состав гумуса, динамических – содержание влаги и подвижное гумусовое вещество. На первую и вторую компоненты проецируется максимальная доля общей дисперсии – 96 и 3,3 % соответственно. В пространстве этих двух компонент координаты точек, соответствующих почвам подтайги, отличаются от локализации точек, относящихся к почвам лесостепи, настоящей и сухой степи. Согласно рис. 1а область почв подтайги, степи и сухой степи по их устойчивым свойствам выделились отдельно, а лесостепь разделилась на две части: в одну вошли все серые почвы, в другую – черноземы глинисто-иллювиальные, что связано с развитием первых на продуктах выветривания бескарбонатных юрских песчаников, вторых – на сартанских высококарбонатных суглинках.

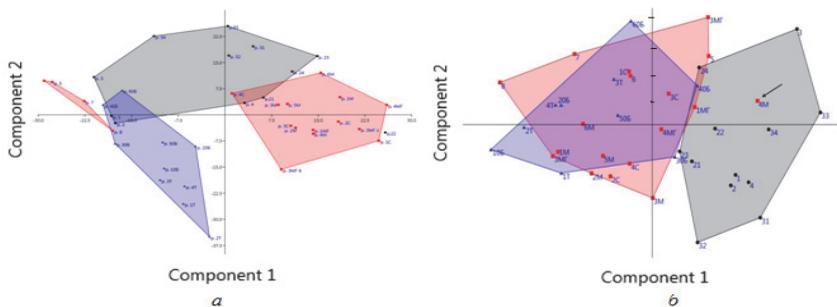


Рис. 1. Метод главных компонент, примененный для характеристики: *a* – устойчивых; *б* – динамических свойств почв в пространстве двух главных компонент. Условные обозначения: ■ – область, занимаемая почвами подтайги; ■ – область, занимаемая почвами лесостепи; ■ – область, занимаемая почвами степи и сухой степи

Процесс функционирования почв, определяющий современный процесс почвообразования и отраженный в динамических свойствах, близок в почвах лесостепи и степи (см. рис. 1, б). На графике их площади перекрываются в большинстве точек по сходному содержанию в почвах фульвокислот 1а фракции и влаги. Наибольший вклад в первую компоненту дает показатель «влажность» ($r = 0,999$), а во вторую – содержание гумуса ($r = 0,997$). Формирование почв лесостепи и степи происходило, преимущественно, на средних и нижних частях склонов, террасах рек в условиях трансаккумулятивных и аккумулятивных ландшафтов. Отдельно выделяется область подтайги. Занимая вершины водоразделов, почвы здесь находятся в условиях элювиального ландшафта, являются автоморфными, обеспечиваемые влагой за счет атмосферного увлажнения, что определяет более высокую их влажность. В них повышено содержание влаги и понижено – гумуса, по сравнению с почвами лесостепи и степи.

Дендрограмма кластерного анализа, построенная методом невзвешенного попарного арифметического среднего (UPGMA) в метрике евклидова расстояния, примененная к устойчивым свойствам почв (рис. 2, а), показала, что почвы степи кластеризуются вместе.

Лесостепные почвы делятся на два абсолютно разных кластера, совпадающих с двумя областями в пространстве главных координат. Почвы подтайги разделились на три отдельные клады. Территориально они находятся на расстоянии 50–150 км друг от друга и развиты на различных породах: юрских и ордовикских песчаниках, верхнекембрийских красноцветных породах. Применение кластерного анализа к динамическим свойствам исследуемых почв (рис. 2б) достоверно (100 % воспроизводимость при бутстреп-проверке) делит исследуемые почвы на два основных кластера, соответствующих высокому и низкому содержанию гумуса и питательных веществ. В кластере, расположенном справа, сгруппированы почвы, находящиеся в условиях подтайги, низкогумусные серые почвы легкого гранулометрического состава лесостепи, а также агропочвы настоящей степи, содержащие наименьшие запасы гумуса. В левом кластере

собраны почвы, имеющие более высокие запасы гумуса и питательных элементов. Объединение почв в более мелкие кластеры («листья») преимущественно определяется увлажненностью ландшафта.

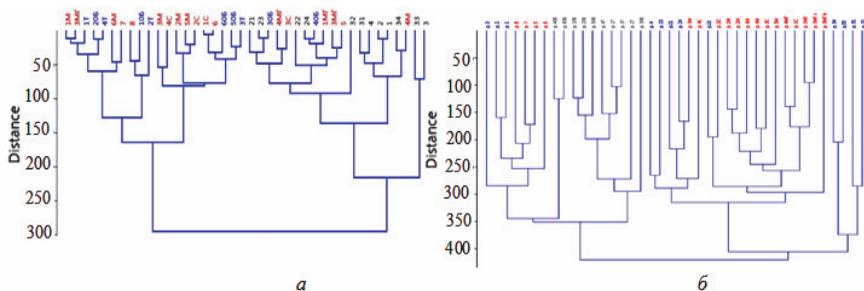


Рис. 2. Кластерный анализ, примененный для характеристики:
a – устойчивых свойств почв; *б* – динамических свойств почв.

Условные обозначения: ■ – область, занимаемая почвами подтайги; ■ – область, занимаемая почвами лесостепи; ■ – область, занимаемая почвами степи и сухой степи

В целом по устойчивым свойствам почвы подтайги, лесостепи и степи отнесены к разным областям и кластерам, что указывает на различия их формирования в прошлом. Близкие значения динамических показателей подчеркивают сходство процессов функционирования почв различных ландшафтов в современную фазу почвообразования. Область почв подтайги выделяется отдельно, что показывает некоторую обособленность их развития.

Список литературы

1. Козлова А. А., Белозерцева И. А., Лопатина Д. Н. Почвы Южного Предбайкалья: разнообразие и закономерности распространения // География и природные ресурсы. 2021. № 1. С. 103–114.
2. Михеев В. С., Коновалова Т. И. Комплексная ландшафтная основа регионального экологического картографирования // Региональный экологический атлас. Концепция, проблематика, научное содержание. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 1998. С. 169–185.

УДК 631.4

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ ПРИАНГАРЬЯ

С. Л. Куклина, Н. Д. Киселева

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
kukl_swet@mail.ru*

The alluvial soils of six tributaries of the Angara River are considered and the main environmental factors determining their specificity are highlighted. The main factors of properties are the hydrodynamic activity of the river, rocks, climate.

Невозможно представить почву, изолированную от окружающей среды, так как она является неотъемлемой частью любой наземной экосистемы и, по сути, ее функцией. Поэтому экологические факторы влияют на морфологический облик почвенного профиля и свойства почв.

В работе рассматриваются аллювиальные почвы шести притоков р. Ангара (табл. 1), которые формировались на высоких и низких поймах рек.

Таблица 1
Информация о притоках р. Ангара, в долинах которых проводились исследования [1]

Название притока	Величина	Берег	км от устья	Длина, км	Площадь бассейна, км ²
Иркут	Средняя	Левый	1714	488	15 000
Куда	Средняя	Правый	1694	226	8030
Китой	Средняя	Левый	1653	316	9190
Белая	Средняя	Левый	1610	359	18 000
Унга	Малая	Левый	1506	85	1660
Одиса	Малая	Левый	1466,5	14	нет данных

Несмотря на широкое разнообразие экологических факторов долин изученных рек, типологическое разнообразие почв невелико. Здесь отмечены: аллювиальные темногумусовые, аллювиальные серогумусовые, аллювиальные перегнойные и аллювиальные слоистые почвы. Основной причиной этого являются поемные процессы, которые играют решающую роль в формировании облика почвенных профилей и их свойств. Но, несмотря на это, в большинстве почв можно выделить специфические особенности, отличающие их друг от друга.

Основными факторами, определяющими специфику рассматриваемых почв являются: гидродинамическая активность реки, горные породы, в которые врезана река; климат.

Левые притоки р. Ангары, такие как Иркут, Китой, Белая берут свое начало в горах Восточного Саяна и имеют достаточно высокую гидродинамическую активность. Повышенные скорости потоков этих рек обуславливают легкий гранулометрический состав аллювиальных почв – от песчаного до легкосуглинистого и часто выраженную слоистость их профилей (кроме почв центральных частей пойм нижних течений рек). А реки Куда, Унга и Одиса характеризуются более медленными скоростями течений, что способствует форми-

рованию почв с более тяжелым гранулометрическим составом (от легкосуглинистого до глинистого).

Особое влияние на свойства изучаемых почв оказывают почвообразующие породы территории исследования, которые отличаются как происхождением, так и химическим составом. Наиболее яркие специфические особенности аллювиальных почв выделяются при формировании на породах верхнего и нижнего кембрия. Нижнекембрийские отложения в основном представлены светлоокрашенными доломитами, что проявляется в химическом составе. Почвы имеют высокие показатели рН и содержат обменные катионы с преобладанием обменного магния над кальцием. Влияние пород на гранулометрический состав выражается в большом участии фракций крупной пыли и мелкого песка в составе почв и отложений. На верхнекембрийских красноцветных отложениях специфика проявляется в наличии красных оттенков в окраске почв, в окарбонировании профиля и частом присутствии в его пределах педогенного и литогенного гипса. Продуктами разрушения данных пород являются средние, тяжелые суглинки и глины, что нашло отражение в тяжелом гранулометрическом составе.

Резко континентальный климат обуславливает протекание криогенных процессов. В профилях почв обнаружены криотурбации, криогенное трещинообразование, присутствие криогенной плитчатости в нижних частях профилей. Выраженность криогенных процессов напрямую зависит от гранулометрического состава почв. В почвах со средне- и тяжелосуглинистым составом их следы наиболее ярко проявлены. С особенностями климата напрямую связаны гумусообразование и гумусонакопление. Часто мощность гумусовых горизонтов в аллювиальных почвах невысокая и редко имеет больше 40 см, только на расширенных участках долин на центральных частях высоких пойм мощность может достигать до 80 см, в резком увеличении в криогенных трещинах. Содержание гумуса сильно варьирует от 2 до 15 %, и зависит от многих факторов. В среднем гумусированность аллювиальных почв Приангарья ниже, чем у их западных аналогов. Фракционный состав гумуса фульватно-гуматный и гуматный, несмотря на достаточно суровые условия гумусообразования, особенно в верховьях рек, берущих начало в Восточном Саяне.

Таким образом, морфоаналитические характеристики аллювиальных почв отражают экологические условия почвообразования, среди которых можно выделить доминирующие (гидродинамическая активность рек, горные породы, климат).

Список литературы

1. Притоки Ангары // Урочище. URL: <https://urochishe.ru/pritoki-angary/> (дата обращения: 15.06.2023).

УДК 631.4

НАРУШЕННЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ ЗЕМЛИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

О. Г. Лопатовская, Е. И. Баснина

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
lopatovs@gmail.com*

The tendency to decrease the area of agricultural land is shown. This is due to violation of legal requirements, improper use of land plots. Degradation of soil quality occurs due to processes: overgrowth, erosion, salinization, formation of landfills.

Сельскохозяйственные земли в Российской Федерации обладают преимуществом в использовании и подлежат особой охране (пашни, пастбища, сенокосы и т. д.). Урожаи, собранные с этой категории земель, обеспечивают нашу страну продовольствием, являются неотъемлемой частью экономики нашего государства. Поэтому остается важным принципом сохранение целевого использования земельных участков, устранение нарушений, и поддержания достигнутого уровня плодородия [1]. На сегодняшний день нет данных, которые бы отражали реальное состояние сельхозугодий, нет достоверной информации об имеющихся нарушениях почвенного покрова. Тем временем, сельскохозяйственные земли под влиянием эрозий, загрязнений, теряют свою устойчивость к разрушению, способность к восстановлению плодородия [2], а значит, происходит деградация особо ценных земель.

В земельном фонде Иркутской области доли сельскохозяйственных угодий составляют 2 874,2 тыс. га, в том числе из них пашен – 1 606,4 тыс. га, сенокосов и пастбищ – 747,3 тыс. га [4]. Большая часть сельскохозяйственных угодий расположено в пределах районов Верхнего и Среднего Приангарья. В развитых сельскохозяйственных районах, расположенных в бассейне р. Ангары, представлена в основном средняя степень развития сельскохозяйственного землепользования, с приречным, долинным и склоново-водораздельным типом размещения. На сегодня существует тенденция к снижению сельхоз площадей, в том числе зачастую ее причинами выступают различные нарушения, приводящие к невозможности использования сельхозземель по целевому назначению.

Один из факторов нарушений – это захламливание земель. Только за 2022 г. на землях сельскохозяйственного назначения нами было выявлено более 40 мест несанкционированных свалок. Такое нарушение одно из основных факторов вывода из оборота земель сельскохозяйственного назначения.

Заращение сельскохозяйственных земель является результатом невыполнения обязательных мероприятий, когда не проводится обработка почвы [1]. Воздействие зарастания сельхозугодий наносит одновременно и пользу, и вред. Пользой здесь выступает длительное нахождение в залежном состоянии, которое способствует повышению плодородия почв. Отрицательным является сокращение площади сельскохозяйственных угодий, причем наиболее продуктивных. Последующее вовлечение заросших угодий в производство требует

значительных финансовых вложений, потребуется раскорчевка растительности механически.

Эрозия почв является одним из наиболее опасных видов деградации земель, который представляет собой разрушение почв, ухудшение физических, химических и биологических свойств почв.

Засоление почвы характеризуется процессом накопления в корнеобитаемом слое солей, угнетающая рост растений. Основной причиной первичного засоления являются: накопление солей в почве вследствие испарения грунтовых вод, солёности материнских пород [3]. В Иркутской области засоленные почвы отмечаются в основном в южной, наиболее освоенной ее части. Из общей площади засоленных земель 33 % приходится на долю сельскохозяйственных угодий Усть-Ордынского Бурятского автономного округа.

Оценка состояния земельных участков осуществлялась при проведении контрольно-надзорных мероприятий (выездов на место с осмотром участка и отбором проб) и при помощи спутниковых снимков. Сбор пространственных атрибутивных данных осуществлялся за период с января 2022 по 2023 г. Их совокупность представляет собой единую базу данных, созданной на основе программного обеспечения QGIS. Общее количество обследуемых земель составило 166 участков.

После определения площадей нарушений, была определена площадь используемых земель. На диаграмме представлена общая площадь сельхозземель, используемых участков, а также площади нарушенных земель в процентном соотношении от общей площади всех земельных участков в Иркутской области (рис. 1).

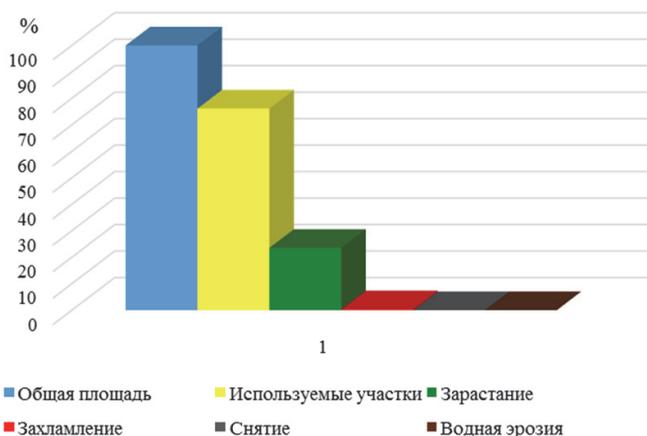


Рис. 1. Диаграмма общей площади и площадей нарушений всех районов области, по состоянию на май 2023г., в %

Данные диаграммы позволяют оценить соотношение обследованных земель. Количество используемых участков составило 70 %. Наиболее часто встречаемым нарушением является зарастание – около 28 %, остальные виды нарушений встречаются реже и составляют менее 1 % от выбранного количества участков. Динамика площади нарушений позволит их редактирование и пополнение в единой базе данных, что означает ее дальнейшее использование в контрольно-надзорной деятельности. Созданная база данных содержит информацию о земельном участке, состоянии поверхности сельхозземель, а выявленные нарушения отражены в картографических материалах.

Таким образом, в настоящее время существует тенденция к снижению площади сельхозугодий. Это обусловлено нарушением требований земельного законодательства, а именно – неиспользованием сельхозземель по целевому назначению.

Список литературы

1. Земельный кодекс Российской Федерации от 25.10.2001 №136–ФЗ (в ред. от 28.04.2023) : Документ опубликован не был. Доступ из справ.Оправовой системы «КонсультантПлюс» в локальной сети Науч. б-ки Иркут. гос. Ун-та.
2. Кононов В. М. Опыт создания регионального геоинформационного ресурса мониторинга земель сельскохозяйственного назначения Краснодарского края // Геоматематика. 2011. № 2. С. 62–68.
3. Лопатовская О. Г., Сугаченко А. А. Мелиорация почв. Засоленные почвы : учеб. пособие. Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010 – 101 с.
4. Сельское хозяйство // Иркутская область : [сайт]. URL: <https://irkobl.ru/region/economy/agroline/> (дата обращения: 21.05.2023).

УДК 631.4

ЭКОЛОГО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОРИТНЫХ ПОЧВ И ЛАНДШАФТОВ СЕВЕРНОЙ МОНГОЛИИ БАЙКАЛЬСКОЙ РИФТОВОЙ ЗОНЫ

Н. А. Маргынова

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
Natamart-irk@yandex.ru*

The influence of the lithogenic basis of the phosphorous soils of Mongolia on the properties of soils and biota, enzymatic activity and on the potential of conservation of biotope biodiversity has been studied.

Почвенный покров является центральным звеном, определяющим тренды эволюционного развития и связывающим функционирование ландшафтов и биотопов всех природных каскадных ландшафтно-геохимическим систем миграционно-аккумулятивными литодинамическими потоками. Почвы малоизмененных природных экосистем особо охраняемых территорий Байкальской рифтовой зоны (БРЗ) приобретают особо важное значение, являясь по сути системной эталонных и редких почв, и могут выступать в качестве фона и эталонов для целей экологического мониторинга Байкальской природной территории.

Экосистемы БПТ образуют 3 основных типа природной среды: тундровой, таежной и степной. Исследовались почвы опорных полигонов тундровых, лесных и степных геосистем юго-западного Прихубсугулья северной Монголии, где находится самое богатое Онголигнурское месторождение одного из крупнейших в мире Хубсугульского бассейна фосфоритов в рамках работы российско-(советско)-монгольской Хубсугульской экспедиции Иркутского и Монгольского госуниверситетов. Одними из основных задач экспедиции являлись вопросы изучения охраны природы и рационального природопользования, возможностей промышленной разработки месторождения фосфоритов района исследования и необходимости сохранения водных ресурсов оз. Хубсугул и оз. Байкал (связанных через р. Селенгу и ее приток р. Эгийн-гол, вытекающий из оз. Хубсугул). Специфичность и высокое фаунистическо-флористическое разнообразие природных экосистем Прихубсугулья обусловлено их развитием на стыке совокупного влияния своеобразных экологических условий Алтае-Саянской горной страны, сибирских таежных лесов и Монголо-Даурских степей. При этом биомы крупных горных систем (Тункинских гольцов, хр. Хамар-Дабан, обнаруживают большее разнообразие в сравнении с примыкающими равнинными территориями. Исследуемая территория сегодня входит в состав Хубсугульского национального парка Ховсгол (рис. 1), который дополняет сеть охраняемых территорий Байкальской рифтовой зоны, известных распространением многих видов эндемиков, редких растений, животных и др. организмов, геологических пород и минералов, относимой к территориям всемирного природного наследия и подлежащей сохранению и охране.

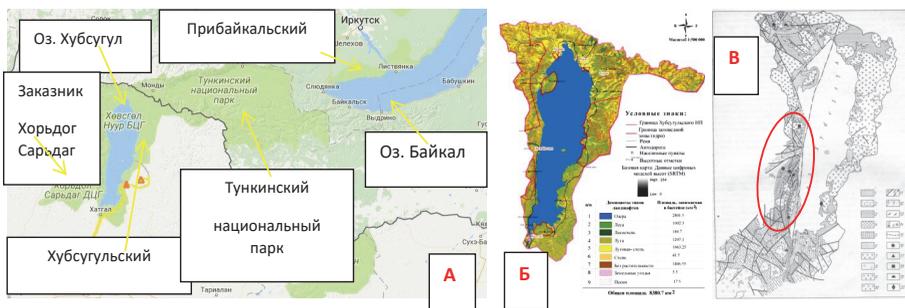


Рис. 1. А – Хубсугульский (Монголия), Тункинский (Бурятия) и Прибайкальский (Иркутская область, Россия) национальные парки юго-западного окончания БРЗ; Б – Ландшафты Хубсугульского национального парка; В – Тектонические разломы окружения оз. Хубсугул, территория исследования

Сегодня на базе национального парка «Хевсгел» (1992 г.) Монголии и Тункинского национального парка Бурятии (1991 г.) предлагается создание двусторонней трансграничной ОПТ (от оз. Хубсугул до оз. Байкал) – Хубсугульского трансграничного национального парка, с включением южной части Прибайкальского национального парка РФ (1986 г.), регионального заказника «Иркутный» (1967 г.), а также – природных парков Монголии и Иркутской области.

Сложность геологической истории, пестрота минерального и элементного состава, стратиграфической и фациальной изменчивости фосфатно-карбонатных пород обусловили формирование в Прихубсугулье специфических «экзотичных» классов почв и биоценозов. Биогенная составляющая изучаемых экосистем создает мощный биогеохимический и щелочной барьер для многих элементов и предотвращает поступление вредных веществ и токсичных элементов в озеро и эвтрофикацию водоема. На фосфатопроявлениях развиваются различные фитоценозы (лиственничные леса, степи, тундровые ценозы) с исключительно богатым травянистым ярусом из злаков и бобовых.

В Прихубсугулье реализуется модель «климатогенной зональности почвообразования», контролируемая и осложняемая разнокачественностью свойств почвообразующих пород, или литогенной матричностью почвообразования. Формирование карбонатно-фосфатно-гумусовых скоагулированных комплексов на фоне остаточной аккумуляции глинистых минералов гидрослюдисто-хлорит-иллитового состава обеспечивает хорошую стабилизирующую способность и достаточно высокое плодородие почв, высокую активность почвенных внеклеточных ферментов (каталазы, дегидрогеназы, инвертазы, целлюлазы, протеазы, липазы, Σ фосфатазы, рис. 2), наибольшая активность которых приурочена к гумусовой толще почв, что создает хорошие условия для развития и сохранения биоразнообразия биотопов и их устойчивого развития. Флора Прихубсугулья включающая более 800 видов, из которых до 75 % приходится на эндемики, представлена 3 основными комплексами: высокогорным (24 %), лу-

гово-лесным (22 %), и степным (22 %). Продуктивность овсяницево-кобрезиево-дриадовых тундровых биотопов варьирует от 148 до 262 г/м² воздушно сухой массы; продуктивность фитомассы травяно-кустарничкового яруса лесного биоценоза (лиственничника злаково-разнотравно-бобового составила 1152 г/м²; полидоминантной разнотравно-злаковой (овсяницево-тонконогово-мятликовой) степи – 68–115 г/м².

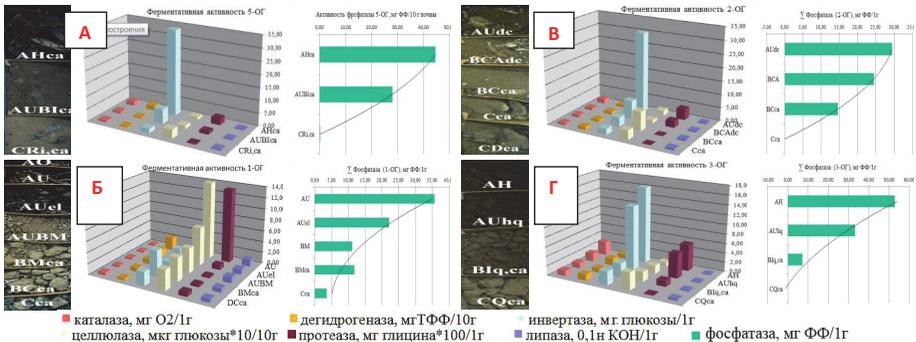


Рис. 2. Ферментативная активность почв, развитых на фосфоритах Прихубсугулья БРЗ:

A – карболитозем перегнойный глинисто-иллювирированный остаточно-(фосфатно)-карбонатный (тундровая зона, 5-ОГ); *B* – темно-серая метаморфическая элювирированная остаточно-(фосфатно)-карбонатная (лесная зона, 1-ОГ); *B* – Чернозем дисперсно-(фосфатно)-карбонатный (степь, 2-ОГ); *Г* – перегнойно-темногумусовая квазиглеевая остаточно-(фосфатно)-карбонатная (лугово-болотная зона, 3-ОГ)

Устойчивость почв фосфоритносных ландшафтов Прихубсугулья можно определить как «потенциал сохранения данной природной системой режима функционирования», формирующийся за счет способности сопротивляться внешнему воздействию посредством буферности (внутренний фактор) и способности сбрасывать с себя нагрузки на другие экосистемы благодаря положению в катене (внешний фактор). Почвенный покров, постоянно обновляясь под влиянием разнообразных экзогенных геолого-геохимических и литодинамических процессов, способствует сохранению биоразнообразия биотопов в пределах локальных участков ландшафта и биосферы в целом, но вопрос о необходимости охраны этих необычных «фосфоритных» ландшафтов, не имеющих аналогов, очень актуален.

УДК 574.589

РОЛЬ АНАЭРОКОНТУРА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ЭКОСИСТЕМЫ ПЕЛАГИАЛИ ЧЕРНОГО МОРЯ

В. В. Мельников

*ФИЦ Институт биологии южных морей, г. Севастополь, Россия
sevlin@rambler.ru*

До недавнего времени еще не знали, что в толще воды между кислородной и сероводородной зонами над всей глубоководной акваторией моря существует уникальный контурный биотоп, где происходят активные биологические процессы, сопоставимые с тем, что происходит у поверхности. Это еще не описанный биотоп субкислородной водной массы, которая находится на стыке кислородного и сероводородного слоев Черного моря в субкислородном слое (Kononov et al., 2005). Автор данной работы обозначил его термином «анаэроконтур» (т. е. противоположный «аэроконтур») и предложил рассматривать его в качестве особого контурного биотопа в глубоководной части Черного моря. Этот контурный биотоп не могли долгое время найти, поскольку до конца прошлого века считалось, что в толще воды, между кислородной и сероводородной зонами резкой границы не существует. Считалось, что между этими водами есть слой смешения O_2 – H_2S или C-слой (Sorokin, 1972), в котором «близкое к стационарному распределение H_2S в Черном море поддерживается непосредственным взаимодействием O_2 и H_2S в слое их совместного сосуществования» (Скопинцев, 1975). Поэтому представления о размытости границ кислородной и сероводородной зон не позволяли даже рассматривать возможность существования контурных биотопов в глубинах Черного моря. Очевидно, что только этим можно объяснить то, что в структуре морских биотопов Ю. П. Зайцева отсутствовала контактная зона или контурный биотоп на границе кислородных и сероводородных вод. Однако после того как выяснилось, что между кислородной и сероводородной зонами действительно существует четко очерченный субкислородный слой (СКС) или Suboxic layer (Kononov et al., 2005). Структуру анаэроконтюра можно описать следующим образом: верхняя контактная зона расположена на стыке аэробной и гипоксической сред, нижняя – на стыке с сероводородной зоной, а между ними расположен анаэроконтур или биотоп субкислородного слоя. Субаэробная контактная зона анаэроконтюра – это верхняя граница субкислородного слоя, среднее положение которой соответствует концентрации кислорода 10 мкмоль/л и средней плотности σ_t 15,7–15,8 (Kononov et al., 2005). Она располагается на середине основного пикноклина, который ограничивает вертикальный водообмен между поверхностным и глубинным слоями вод, что является одной из причин возникновения гипоксических и анаэробных условий ниже него (Kononov et al., 2005). У субаэробной контактной зоны концентрируются высокоактивные прокариотические сообщества, играющие важную роль в биогеохимическом круговороте. Здесь наблюдается высокая концентрация седиментационных частиц, цианобактерий,

нитрифицирующих бактерий, гаммапротеобактерий, актинобактерий, альфа-протеобактерий, метанотрофов, бактериальных агрегатов, зоофлагеллят и метазойных организмов (Schubotz et al., 2009; Kirkpatrick et al., 2006). Эта контактная зона привлекает холодноводный зоопланктон, который концентрируется здесь днем во время суточных вертикальных миграций и в период диапаузы, формируя у изооксигены 10 мкмоль/л сверхплотные скопления копепод с численностью до нескольких тыс. экз./м³ (Melnikov et al., 2021). Центральная часть анаэроконтра, в которой кислород присутствует в следовых концентрациях 3–5 мкмоль/л (Konovalov et al., 2005) в верхней его части, а в нижней – отсутствует как кислород, так и сероводород (Konovalov et al., 2005; Capet et al., 2015). В центре анаэроконтра всегда наблюдаются пик мутности на фоне максимума концентрации нитритов, высокой численности бактерий и неорганических частиц. В этом слое почти нет фосфатов, нитратов и аммония. Тут обитают как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы: цианобактерии, денитрифицирующие бактерии, метанотрофы, метаногены, бактерии, восстанавливающие железо, бактерии, восстанавливающие марганец, анаммокс-бактерии, пурпурно-серные и магнитотаксические бактерии (Schulz-Vogt et al., 2019). Размеры этих бактерий меняются в широких пределах, например, свободно плавающие магнитотаксические бактерии могут достигать в диаметре 5 μm , среди анаммоксических и денитрифицирующих бактерий тут обнаружены как свободноживущие бактерии (0,2–2,0 μm), так и в составе бактериальных агрегатов в виде мелких взвешенных (> 2–30 μm) и крупных оседающих (> 30 μm) частиц. Нижняя часть анаэроконтра или аэробная контактная зона, которая соответствует хемоклину (определяется по первому появлению сероводорода в толще воды), расположенному на глубине от 81 до 99 м (Jørgensen et al., 1991). Исследования с использованием радиоактивных меток H₂S, показали, что здесь наблюдается как самая высокая скорость окисления сульфидов, вплоть до нескольких микромолей на литр в сутки, так и самые высокие скорости ассимиляции CO₂ (Jørgensen et al., 1991). Основными растворимыми продуктами окисления сульфидов были тиосульфат (68–82 %) и сульфаты (Jørgensen et al., 1991). Очевидно, именно этим объясняется повышение мутности у нижней границы субкислородного слоя. Ниже субкислородного слоя находится сульфидная зона, в которой преобладает сульфатредукция, залегающая до глубины 2200 м. Эти организмы облигатно существуют за счет анаэробных процессов и не переносят кислород. Микрофлора тионовых бактерий может составлять до 40 % биомассы от всего бактериопланктона, а продукция в зоне максимума достигает 40–60 мг/м³ и в отдельные периоды превышает первичную продукцию (Сорокин, 1982).

Список литературы

1. Скопинцев, Б. А. Формирование современного химического состава вод Черного моря. Л. : Гидрометеоиздат, 1975. 336 с.
2. Сорокин Ю. И. Черное море. Природа. Ресурсы / под. ред. М. Е. Виноградова. М. : Наука, 1982. С. 216.

3. Recent decline of the Black Sea oxygen inventory / Capet A., Stanev E., Beckers J. -M., Murray J., Grégoire M. // *Biogeosciences Discussions*. 2015. Vol.12.P. 16233–16253. DOI: 10.5194/bg-13–1287–201
4. Sulfide oxidation in the anoxic Black Sea chemocline / Jørgensen B., Fossing H., Wirsén C., Jannasch H. // *Deep Sea Res. Part A. Oceanographic Research Papers*.1991. Vol. 38, Suppl. 2. P. S1083–S1103. [https://doi.org/10.1016/S0198-0149\(10\)80025-1](https://doi.org/10.1016/S0198-0149(10)80025-1)
5. Konovalov S., Murray J., Luther G. Basic Processes of Black Sea Biogeochemistry // *Oceanography*. 2005. Vol. 2. P. 28–35.
6. Distribution of *Sprattus sprattus phalericus* (Risso, 1827) and zooplankton near the Black Sea redoxcline / V. Melnikov, N. Minkina, L. Melnik, F. Pollehne // *Journal of Fish Biology*. 2021. Vol. 99, N 4. P. 1393–1402.
7. Detection of microbial biomass by intact polar membrane lipid analysis in the water column and surface sediments of the Black Sea / F. Schubotz, S. G. Wakeham, J. S. Lipp, H. F. Fredricks, K. Hinrichs // *Environmental Microbiology*. 2009. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01999.x
8. Effect of large magnetotactic bacteria with polyphosphate inclusions on the phosphate profile of the suboxic zone in the Black Sea / H. N. Schulz-Vogt, F. Pollehne, K. Jürgens, H. W. Arz, B. Beier, R. Bahlo, O. Dellwig, J. V. Henkel, D. P. R. Herlemann, S. Krüger, T. Leipe, T. Schott // *The ISME Journal*. 2019. Vol. 13. P. 1198–1208.
9. Sorokin Y. I. The bacterial population and the processes of hydrogen sulfide oxidation in the Black Sea // *Journal du Conseil International Exploration de la Mer*. 1972. Vol. 34. P. 423–454.

УДК 632.95.025.8

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЦИТОХРОМА В У ФОРМ КЛЕЩА *TETRANYCHUS URTICAE* КОШН УСТОЙЧИВОГО К БИФЕНАЗАТУ

Е. С. Окулова, И. А. Тулаева, Т. В. Матвеева

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
г. Санкт-Петербург, Россия
elenaok.advert@gmail.com

Bifenazate is a carbazate acaricide for the control of phytophagous mites infesting agricultural and ornamental crops. The emergence of resistance to it is associated with mutations in the region of cytochrome oxidase b. The report will present data on the cytochrome b gene polymorphism of mites contrasting for resistance to bifenazate.

Паутинный клещ *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) – опасный многоядный вредитель сельскохозяйственных культур, зачастую проявляющий высокую устойчивость к акарицидам [1].

Бифеназат – карбазатный акарицид, разработанный компанией Unigoyal Chemical (Chemtura Corporation) для борьбы с клещами-фитофагами, поражающими сельскохозяйственные и декоративные культуры, относящийся к IV классу опасности. Основным активным метаболитом этого препарата диазен. Препарат проявляет высокую токсичность как при пероральном, так и при местном применении на всех стадиях жизненного цикла *Tetranychus urticae* и *Panonychus citri*. Также он обладает длительной активностью и высокой селективностью [2].

Действие его основано на ингибировании транспорта электронов. Показано, что возникновение устойчивости к этому соединению связано с мутациями в области цитохромоксидазы b [3; 4]. Соответственно, резистентность к бифеназату наследуется по материнской линии и обусловлена мутациями в высококонсервативных участках (cd1-спираль и ef-спираль) сайта Qo цитохрома b. В докладе будут представлены данные по полиморфизму гена цитохрома b у форм, контрастных по устойчивости к препарату и роли мутаций G134S, S149F, D169G, G132A, G126S, P262T, S141F, I136T, A133T [3–4] и их комбинаций в проявлении устойчивости к бифеназату.

Список литературы

1. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review / Van Leeuwen T., Vontas J., Tsagkarakou A., Dermauw W., Tirry L. // Insect Biochem Mol Biol. 2010. Vol. 40, N 8 P. 563–572.
2. Xue W., Wybouw N., Van Leeuwen T. The G126S substitution in mitochondrially encoded cytochrome b does not confer bifenazate resistance in the spider mite *Tetranychus urticae* // Exp Appl Acarol. 2021. N 85. P. 161–172.
3. Identification and characterization of new mutations in mitochondrial cytochrome b that confer resistance to bifenazate and acequinocyl in the spider mite *Tetranychus urticae* / S. M. Fotoukkaia, Z. Tan, W. Xue, N. Wybouw, T. Van Leeuwen // Pest Manag Sci. 2020. Vol. 76, N 3. P. 1154–1163.
4. Toxicity of bifenazate and its principal active metabolite, diazene, to *Tetranychus urticae* and *Panonychus citri* and their relative toxicity to the predaceous mites *Phytoseiulus persimilis* and *Neoseiulus californicus* / N. Ochiai, M. Mizuno, N. Mimori, T. Miyake, M. Dekeyser, L. J. Canlas, M. Takeda // Exp Appl Acarol. 2007. Vol. 43, N 3 P. 181–97.

УДК 581.19

РАСТЕНИЯ С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ СЕНСОРАМИ: СОЗДАНИЕ И ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ДЕЙСТВИЯ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОРОВ

**А. А. Печёрина, М. Н. Агеева, М. А. Гринберг, Д. А. Занегина,
А. А. Димитриева, М. М. Ладейнова, А. А. Брилкина, В. А. Воденев**

*Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород, Россия
pechyorinaa@gmail.com*

Usage of model plants with genetically encoded fluorescent sensors in research of different stressors influences becomes popular in the last decade. These plants can use in research of different stress factors on different level: from cell to whole organism.

Изучение механизмов действия различных стрессирующих воздействий на растения неизбежно затрагивает тему активации и работы сигнальных систем. Сигнальные системы кальция и АФК вызывают интерес в первую очередь участием в передаче сигнала о самых разнообразных стрессорах, а также малым размером сигнальной молекулы. Еще одним интересным примером такого типа сигнальных систем может выступать протонная сигнальная система. Измерение уровня кальция, активных форм кислорода и pH возможно с различным уровнем точности, селективности и степени повреждения растения. Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры становятся идеальным выбором, потому что они высокоселективны, обладают низкой степенью фотообесцвечивания и фотоблещивания, они постоянно нарабатываются в растении и для их активации не нужно добавлять активаторы. Растения с такими сенсорами называются модельными, и, как правило, они совпадают с классическими модельными растениями – табаком и арабидопсисом. Однако все больше вызывает интерес использование модельных сельскохозяйственных растений – картофеля, томата, пшеницы, риса, кукурузы. Другая сторона использования таких модельных растений – возможность визуализировать изменения во всем растении, а не только в отдельных клетках и органах. Целью работы являлось создание растений табака и картофеля с флуоресцентными сенсорами Pt-GFP и Case12 и исследование с помощью них работы кальциевой и протонной сигнальных систем при действии различных стрессоров.

Трансгенные растения получали с помощью агробактериальной трансформации геном ратиометрического pH-чувствительного сенсора Pt-GFP или Ca²⁺-чувствительного сенсора Case12. В качестве эксплантов использовали кусочки стебля (картофель) или листьев (табак).

Факт вставки генов подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции, а отбор линий растений с самой яркой светимостью проводили с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия). Возбуждение Pt-GFP осуществляли при 405 и 488 нм, Case12 – при 488 нм, флуоресценцию принимали в диапазоне 505–525 нм.

Ратиометричность сенсора Pt-GFP позволяет перевести флуоресцентный сигнал сенсора в единицы pH. Свойство ратиометричности сенсора связано с изменением спектральных характеристик белка, имеющего два пика на спектре возбуждения флуоресценции – при 390 и 470–490 нм. При кислых значениях pH окружения выражены оба пика, а при щелочных значениях – только правый. Увеличение значения отношения F490/395 свидетельствует о защелачивании pH, снижение – о закислении. Для перевода значений флуоресценции сенсора в pH проводили калибровку сенсора в растительных тканях. Листья или целые растения инкубировали в буферных растворах с pH от 4 до 9 с 250 мкМ протонфора карбонилциани-м-хлорфенилгидразона в течение 3–4 ч, а затем получали их флуоресцентные изображения. На основе полученных значений флуоресценции сенсора при различных pH раствора строили график зависимости отношения F490/F390 от pH и уравнение зависимости pH от F490/F390 в программе GraphPad Prism.

Сенсоры Pt-GFP и Case12 экспрессируются во всех тканях и органах, поэтому изменение pH или концентрации кальция в цитозоле можно смотреть на всех уровнях: от клеточного до организменного. Для исследования этих сигнальных молекул в листьях использовали установку флуоресцентного имиджинга DVS-03 (ИФТ РАН, Россия), а для исследования всего растения – установку PlantExplorerPro+ (PhenoVation, Нидерланды).

Растения с флуоресцентными сенсорами можно использовать для исследования сигнальных систем при действии стрессорирующих факторов различной природы. Нагревание кончика листа приводит к распространению кальциевой и pH-волн в нераздражаемые области. Изменение pH цитозоля связано с инактивацией протонных помп, возможно, посредством кальция. Охлаждение всего листа приводило сначала к закислению, а затем к защелачиванию. Эти изменения температуры не сказываются на работе и структуре сенсора,

Поедание листа картофеля личинкой колорадского жука приводило к наибольшим изменениям цитозольного pH, в то время как наблюдались мощные изменения электрического потенциала, чего не наблюдалось при просто механическом воздействии. Это может быть связано тем, что личинки оказывают не только механическое, но и химическое воздействие своей слюной.

Засоление не приводит к ранним изменениям pH в корне, стебле или листьях, которое можно было бы интерпретировать как сигнальные. Закисление цитозоля в листьях наблюдается при действии высоких (100–400 мМ) концентраций NaCl. Волны изменения кальция в стебле фиксируются уже в первые 5 мин после начала засоления, а их ингибирование приводит к снижению начальных изменений фотосинтеза, в частности нефотохимического тушения.

Растения с флуоресцентными генетически-кодируемыми сенсорами являются удобными объектами и способами исследования сигнальных путей. Возможность прижизненно и в режиме реального времени проводить исследования на таких растениях выделяет их среди других способов исследования концентрации ионов.

Работа выполнена при поддержке проекта Национального центра физики и математики (НЦФМ) «Экспериментальная лабораторная астрофизика и геофизика».

УДК 574.583

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭКОСИСТЕМЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

**О. О. Русановская¹, С. Б. Бехтин², А. А. Демидова¹, С. В. Шимараева¹,
Е. А. Зилов¹**

¹*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия*

²*MaritimeAI, г. Москва, Россия
rusanovskaya-o.o@mail.ru*

The results of zooplankton research using an automated sample analysis system based on artificial intelligence are presented.

Нейронные сети используются в различных отраслях и набирают всё большую популярность в современном мире. Они представляет собой математическую модель, построенную по принципу организации и функционирования биологических нейронных сетей.

Проект долговременного экологического мониторинга оз. Байкал, основателем которого является выдающийся исследователь профессор М. М. Кожов, реализуется в НИИ биологии «ИГУ» с февраля 1945 г. [5; 6; 8] и внесен в Книгу рекордов России [7]. За время существования проекта (78 лет) отобрано около 31 тыс. проб из разных слоев воды, из которых 12 тыс. для оценки видового состава и численности зоопланктона и 19 тыс. – для оценки фитопланктона, результаты обработки которых внесены в единую базу данных, включающую более 7 миллионов записей. Обработка проб осуществляется методом микроскопирования, позволяющим учесть видовой состав и численность каждого вида планктонных организмов. Это достаточно время- и трудозатратный процесс, выполняемый высококвалифицированными специалистами. Внедрение методов машинной обработки позволит при сохранении преемственности вывести проект на новый технический уровень.

В сентябре 2022 г. исследователи НИИ биологии ИГУ совместно с командой облачной платформы Yandex Cloud, предоставляющей облачные вычислительные мощности и инфраструктуру, экспертами по созданию алгоритмов машинного обучения для морских экосистем компании MaritimeAI и специалистами Фонда поддержки прикладных экологических разработок и исследований «Озеро Байкал», начали использовать систему с нейросетями в мониторинге экосистемы оз. Байкала. Алгоритм, основанный на искусственном интеллекте, анализирует пробы воды из озера, определяет и классифицирует содержащиеся в ней взвешенные частицы органического происхождения.

Реализация проекта проходит в два этапа. На первом этапе команда НИИ биологии ИГУ подготовила более 87 тыс. снимков планктона. Команда MaritimeAI занималась разработкой системы автоматического анализа проб (СААП), которая включает в себя пользовательский интерфейс для работы специалистов НИИ, подсистемы хранения и обработки проб, интеграцию с Яндекс.Толокой

[2]. В Толоке работа с изображениями планктона проходила по трём категориям: детекция (разметка и выделение организмов, имеющих на фотографии), валидация (подтверждение правильности выделения объектов), классификация (определение видовой принадлежности организма). Запустили эту систему в облачной инфраструктуре Yandex Cloud. А также написанием программного кода алгоритмов детекции и классификации, их тестированием с помощью сервиса Yandex DataSphere. Более подробно об этой разработке написано в статье @spiralis «Исследуем микроорганизмы Байкала. Открытый проект MaritimeAI и Yandex Cloud» [1]. Пользовательский интерфейс позволяет сотрудникам НИИ биологии ИГУ самостоятельно повышать эффективность и контролировать качество работы алгоритма.

На втором этапе в систему внедряются подсистемы автоматической детекции и классификации, что позволяет часть изображений обрабатывать без участия специалиста. Сейчас идет активное обучение модели на пополняющемся наборе данных. Он пополняется изображениями проб, напрямую из поля зрения микроскопа, которые специалисты загружают в СААП. Нейросеть продолжает обучаться в сервисе для разработки и эксплуатации ML-алгоритмов Yandex DataSphere. Датасет изображений проб с разметкой [4] и предобученные ML-модели [3] командой разработчиков проекта и ученых выложены в свободный доступ. Их можно использовать для тестирования гипотез по детекции, сегментации и классификации планктонных организмов, что поможет разрабатывать системы мониторинга для водоемов по всему миру.

Сейчас СААП умеет работать с 70 формами зоопланктона, которые чаще всего встречаются в пробах. Изображения проб байкальской воды с лабораторных микроскопов продолжают поступать в систему, где детектируются все возможные объекты в пробе, затем определяется их видовая принадлежность и формируются отчетные карточки.

Для сравнения результатов микроскопирования и машинной обработки проб проанализированы карточки обработки 5 проб зоопланктона (рис. 1).

Анализ результатов показал, что в 30 % случаев различия в видовом разнообразии и численности между ручной и машинной обработкой отсутствуют. В 40 % нейросеть недосчитывает часть организмов, чаще всего это представители типа Rotifera, которые на снимках могут накладываться друг на друга. В 30 % нейросеть показывает большие показатели численности, чем при ручной обработке, в основном это представители вида *Epischura baikalensis* Sars, 1900. В целом различий в видовом разнообразии между ручной и машинной обработкой проб не наблюдается, нейросеть определяет все виды, находящиеся в пробе. Различия отмечены только в численных показателях.

Разработанная система может стать важным элементом программы мониторинга Байкала «Точка №1», необходимой для прогнозирования экологического состояния озера, влияния климатических изменений на его экосистему, контроля биологической безопасности и распространения инвазивных видов вселенцев, инструмента описания и открытия новых видов.

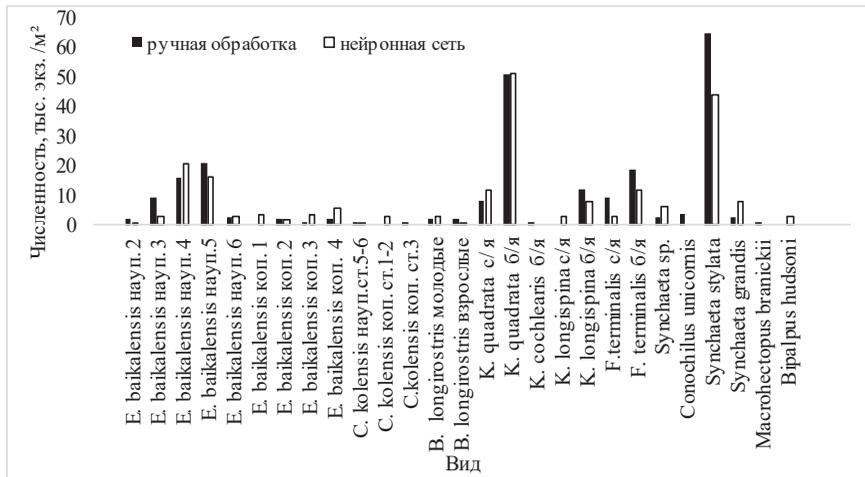


Рис. 1. Результаты микроскопирования и машинной обработки проб зоопланктона Южного Байкала в слое 0–50 м, Точка №1

Список литературы

1. Исследуем микроорганизмы Байкала. Открытый проект MaritimeAI и Yandex Cloud. URL: <https://habr.com/ru/companies/yandex/articles/689592/> (дата обращения 18.07.2023)
2. Толока. URL: <https://toloka.yandex.ru/tasks/> (дата обращения 18.07.2023).
3. Baseline models for Baikal zooplankton recognition. URL: <https://github.com/baikal-zooplankton/BaselineModels> (дата обращения: 18.07.2023).
4. Dataset of Baikal plankton. URL: https://github.com/baikal-zooplankton/Baikal_Dataset (дата обращения 18.07.2023).
5. Kozhov M. M. Lake Baikal and its life. The Hague: Dr. W. Junk, 1963. 344 p.
6. Kozhova O. M. Hydrobiological monitoring of Baikal // Verh. Internat. Verein. Limnol. 1981. Vol. 24. P. 518–522.
7. “Point N 1” 2020. Long Term Ecological Monitoring of Lake Baikal. URL: <http://www.bioinstitute.ru/monitoring/engl> (accessed 18.07.2023)
8. Some recent trends regarding Lake Baikal phytoplankton and zooplankton / E. A. Silow, L. S. Krashchuk, K. A. Onuchin, H. V. Pislegina, O. O. Rusanovskaya, S. V. Shimaraeva // Lakes & Reservoirs: Research and Management. 2016a. Vol. 21: P. 40–44. <https://doi.org/10.1111/lre.12119>

УДК 574.2:574.583(262.5)

МИКРОЗООПЛАНКТОН СЕВАСТОПОЛЬСКОЙ БУХТЫ: ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И СТРУКТУРА СООБЩЕСТВА В ЛОКАЛЬНЫХ АКВАТОРИЯХ В ВЕСЕННИЙ ПЕРИОД

С. А. Серегин, Е. В. Попова

*Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН,
г. Севастополь, Россия
serg-seryogin@yandex.ru*

Changes in the abundance, species diversity, and structure of metazoan microzooplankton communities (MM) in the Sevastopol Bay and open seashore at the end of the spring hydrological season were studied. An increase in water temperature was accompanied by a growth in the MM total abundance and a restructuring of the community due to the dominance of a heat-loving invader species, which is most pronounced inside the bay. The changes in biodiversity were opposite to the trophic gradient of local water areas.

Акватория Севастопольской бухты, вытянутая в широтном направлении на 7,5 км, является удобным объектом гидролого-гидрохимических и биологических исследований в естественном градиенте природных и антропогенных факторов. Известно, что разные участки Севастопольской бухты различаются степенью загрязнения и трофности воды. В конце весеннего гидрологического сезона 2021 г. мы исследовали изменения численности, видового разнообразия и структуры сообществ метазойного микрозоопланктона (ММ) в разных акваториях Севастопольской бухты и открытом взморье. Условия среды на выбранных станциях составляли градиент, характеризующийся разной степенью воздействия на биоту природных и антропогенных факторов. Отбор проб ММ и сопутствующие гидрологические измерения проводили в трех слоях водного столба: от поверхности до 10–метровой глубины. Обилие организмов, индексы видового разнообразия (Маргалефа, Пиелу, Симпсона, Шеннона), степень сходства и различия сообществ рассчитывали для последовательных слоев: поверхностного, среднего (0–5 м) и придонного (5–10 м), а также в среднем для всего столба воды.

На фоне повышения температуры воды с конца мая до 1-й декады июня зарегистрировано значительное возрастание численности ММ. В мае средняя численность в 10-метровом слое составляла в разных акваториях от 10 до 40 тыс. экз. м⁻³, а в конце 1-й декады июня – возросла в 1,5–3,6 раза. В пространственном отношении в оба срока наблюдался тренд увеличения численности от открытых вод вглубь бухты, совпадающий с температурным трендом локальных акваторий. Абсолютный максимум численности отмечен в июне в поверхностном слое во внутренней части бухты – более 720 тыс. экз. м⁻³.

Количественные изменения обилия сопровождались и во многом определялись изменениями качественного состава ММ (рис. 1). В начале периода основную роль в численности и определении сходства/различий в структуре сообществ играли аборигенные виды копепод, коловратки, велигеры моллюсков.

При потеплении воды выше 18–19 °С резко возрастала роль теплолюбивого вселенца, копеподы *Oithona davisae* Ferari and Orsi, 1984. Максимумы численности вида-вселенца в ряду локальных акваторий от открытых вод к внутренним водам бухты возрастали более, чем на порядок: с 23 до 550 тыс. экз. м⁻³. Направленность изменений численности *O. davisae* в исследованных локальных акваториях совпадала с увеличением уровня их загрязнения и трофности: чем далее вглубь бухты располагались станции, тем была выше как абсолютная, так и относительная численность вселенца и его роль в структуре сообщества. Этот вид обладает индикаторными свойствами антропогенного влияния.

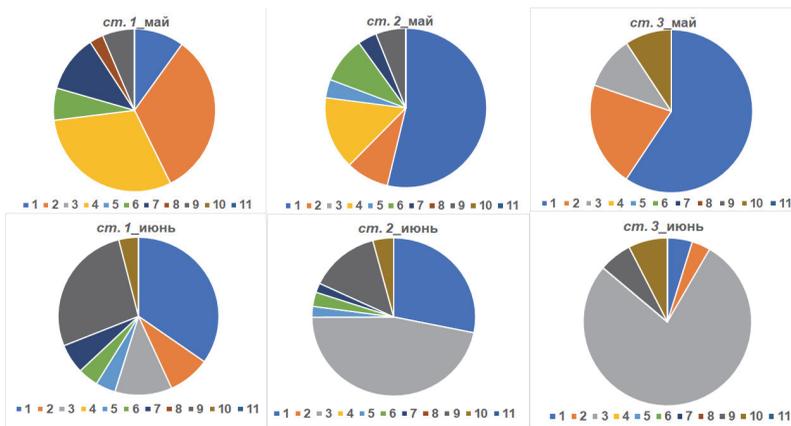


Рис. 3. Вклад основных видов и групп ММ в структуру сообществ в разных участках акватории Севастопольской бухты в весенне-летний период.

Ст. 1 – открытое взморье, ст. 2 – устье бухты, ст. 3 – внутри бухты.

1 – *Acartia*; 2 – *Oithona similis*; 3 – *O. davisae*; 4 – *Paracalanus parvus*; 5 – *Centropages ponticus*; 6 – Harpacticoida; 7 – Cladocera; 8 – Cirripedia; 9 – Mollusca; 10 – Rotifera; 11 – *Oikopleura dioica*

Видовое разнообразие сообщества ММ в весенний период в целом характеризовалось умеренно высокими величинами использованных индексов (табл. 1). Наибольшим видовым богатством на всех станциях характеризовался средний слой вод. В пространственном отношении уменьшение видового разнообразия наблюдалось в направлении от открытого взморья внутрь бухты.

Таблица 1

Средневзвешенные индексы видового разнообразия сообществ метазойного микрозоопланктона в мае – июне 2021 в разных участках Севастопольской бухты

Индекс разнообразия	Ст. 1		Ст. 2		Ст. 3	
	май	июнь	май	июнь	май	июнь
Индекс Шеннона	2,20	1,89	1,95	1,57	1,76	1,28
Индекс полидоминантности	6,72	3,98	4,11	2,86	4,09	2,42
Индекс Пиелу	0,74	0,61	0,66	0,52	0,61	0,46
Индекс Маргалефа	2,01	2,04	1,80	1,89	1,56	1,47

В согласии с градацией оценок трофического статуса водных объектов в схемах КИОВР (комплексное использование и охрана водных ресурсов) открытое взморье соответствовало в мае олиготрофным водам, а в июне – переходным от олиготрофных к мезотрофным. Устье бухты характеризовалось как олиготрофный на грани перехода в мезотрофный район в начале наблюдений и мезотрофно-эвтрофный – в конце. Статус вод внутренней части бухты оценивался в разные сроки, соответственно, как мезотрофный и эвтрофный. По сравнению с позднелетним и осенним сезонами оценки трофности вод локальных акваторий были немного ниже, что вполне объяснимо. Максимумы речного стока уже прошли. Рекреационная нагрузка и, соответственно, количество бытовых стоков в исследуемый сезон еще далеки от своих максимумов. Так называемый «летний» пик развития фитопланктона, характерный для акваторий под антропогенным прессом, и не свойственный открытым районам моря, еще не наступил. Таким образом, все 3 основных источника поступления биогенов в изученный период не оказывали максимально отрицательного воздействия на уровень трофности акваторий бухты и видовое разнообразие сообщества ММ.

В целом показатели обилия, видового разнообразия и структуры сообщества ММ в локальных акваториях отражают как сезонные, так и пространственные изменения их трофического статуса в естественном градиенте открытое взморье – внутреннее пространство Севастопольской бухты и могут использоваться для его опосредованной оценки.

УДК 632.95.025.8

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ *TETRANYCHUS URTICAE* КОСН К РАЗЛИЧНЫМ АКАРИЦИДАМ

И. А. Тулаева, Т. В. Матвеева, С. В. Сокоорнова

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
г. Санкт-Петербург, Россия
tetranychusurticae0603@gmail.com

We present a new approach to obtain DNA for the assessment of acaricide resistance in single mites using polymerase chain reaction.

Паутинный клещ *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) – многоядный вредитель широкого спектра кормовых растений, который включает более 1100 видов из более чем 250 семейств [1]. Появление резистентных популяций клеща приводит к увеличению объёма и частоты обработок акарицидами, и, как следствие, к ухудшению качества продукции. Быстрое выявление резистентных клещей в популяциях вредителя позволяет своевременно и целенаправленно предпринимать шаги по защите растений. Для некоторых пестицидов, например, карбазатного акарицида бифеназат, развивающаяся устойчивость клеща связана с мутациями в гене, кодирующем цитохромоксидазу b [2–3].

Такие мутации в митохондриальной ДНК наследуются по материнской линии, поэтому выявление таких мутаций в каждой особи в пределах одного потомства представляет большой интерес. Так же как и то, как мутации устойчивости целевого сайта способствуют фенотипу устойчивости. Выделение ДНК из единичных клещей общепринятыми методами, например, с помощью СТАВ-буфера встречается в литературе [4; 5], хотя в силу размера объекта и невысокой концентрации ДНК на последних этапах очистки это технически сложная задача. Нам удалось получить препарат ДНК индивидуального клеща, пригодный для проведения полимеразной цепной реакции путем 5 мин кипячения единичной особи в 10 мкл ТЕ буфера. После чего проводилась ПЦР в конечном объеме 20 мкл. В состав смеси входили: 10 мкл DreamTaq™ Green Master Mix (2X) (Thermo-Scientific), содержащей 5 пикомолей каждого праймера, и 10 мкл препарата ДНК.

Предложенный метод может быть использован, как первый шаг в экспресс-оценке устойчивости *T. urticae* к различным акарицидам, вместо более трудоемких классических методов выделения ДНК.

Список литературы

1. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review / T. Van Leeuwen, J. Vontas, A. Tsigarakakou, W. Dermauw, L. Tirry // *Insect Biochem Mol Biol*. 2010. Vol. 40, N 8 P. 563–572.
2. Xue W., Wybouw N., Van Leeuwen T. The G126S substitution in mitochondrially encoded cytochrome b does not confer bifenazate resistance in the spider mite *Tetranychus urticae* // *Exp. Appl. Acarol*. 2021. N 85 P. 161–172.

3. Identification and characterization of new mutations in mitochondrial cytochrome b that confer resistance to bifenthrin and acequinocyl in the spider mite *Tetranychus urticae* / S. M. Fotoukchiai, Z. Tan, W. Xue, N. Wybouw, T. Van Leeuwen // Pest Manag Sci. 2020. Vol. 76, N 3. P. 1154–1163.

4. Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important phytoseiid mites / M. Navajas, J. Lagnel, G. Fauvel, G. De Moraes // Exp Appl Acarol. 1999. N 23. P. 851–859.

5. The relative contribution of target-site mutations in complex acaricide resistant phenotypes as assessed by marker assisted backcrossing in *Tetranychus urticae* / M. Riga, S. Bajda, C. Themistokleous, S. Papadaki, M. Palzewicz, W. Dermauw, J. Vontas, T. V. Leeuwen // Sci Rep. 2017 Vol. 7, N 1. P. 9202.

УДК 616.594:574.24

ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ВОЛОСАХ СТУДЕНТОВ ЧИТИНСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ

Д. Д. Дамбаев, Р. Д. Дамдинова, А. Ю. Матафонов, Ж. Б. Митупов,
В. Б. Убушеева, Д. В. Ярославский

*Читинская государственная медицинская академия, г. Чита, Россия
andrejmetafonov2@gmail.com*

This study was carried out on 50 hair samples from students of the Chita State Medical Academy. Their chemical composition was studied in comparison of the gender groups of students, taking into account the dependence on smoking. It was revealed that for strontium, copper, lead and iron, girls recorded their large amounts in their hair. This may be due to the slow renewal of their hair, as well as the greater length compared to young men. For iron and manganese, the increased levels of their accumulation may be due to the chemical composition of water enriched with these microelements.

Волосы человека удобный объект исследования, так как их сбор не требует специальных навыков, безболезнен для пациента и позволяет оценить изменения химического состава тканей организма, формирующихся в течение длительного времени. Забайкалье характеризуется наличием значительного числа природных и техногенных биогеохимических провинций, и районов, на территории которых у проживающих людей могут формироваться нарушения метаболизма биоэлементов из-за дисбаланса или дефицита микроэлементов [1].

Целью работы было определение содержания в волосах студентов ЧГМА содержания Ca, Sr, Ba, Cu, Pb, As, U, Mn, Fe и Zn в зависимости от пола и потребления табачных изделий.

Материалы и методы. Для исследований в январе-феврале 2023 г. были отобраны 50 проб волос студентов ЧГМА проживающих в течение 2-х лет в городе Чита. Соотношение проб: 29 – мужчины, 21 – женщины. Определение содержания химических элементов в пробах волос проводили рентгенофлуоресцентным методом полного внешнего отражения на спектрометре S2 Picofox (Bruker Nano GmbH, Германия). Пробы волос взвешивали на аналитических весах и навески массой 50,0–100,0 мг подвергали мокрому озолению. Для озоления проб их переносили в кварцевые стаканчики, приливали по 1000,0 мкл концентрированной HNO_3 и добавляли по 100,0 мкл 30%-ного раствора H_2O_2 , после пробы выдерживали до полного испарения жидкости в сухожаровом шкафу и прокаливали в муфельной печи при 500 °С.

Полученные сухие осадки растворяли в сверхчистой воде и к аликвоте добавляли внутренний стандарт (соль Ge с концентрацией 2,50 мг/дм³). Наносили 10,0 мкл пробы на кварцевый прободержатель, а после высушивали. После снятия спектров содержания элементов в пробе они подвергались обработке в программе Spectra ver.7.8.2.0 с определением среднего содержания, ошибки среднего и пределов обнаружения.

Результаты и их обсуждение. Химический состав волос студентов ЧГМА по гендерному принципу имел существенные отличия. В волосах девушек, имеющих средний возраст 20,2 лет, были зафиксированы повышенные концентрации стронция и бария, по сравнению с студентами-мужчинами (средний возраст – 21 год). При этом у некурящих юношей уровень стронция был максимальным, а у курящих снижен (рис. 1). По содержанию соединений кальция выявлено сниженное его количество в волосах у девушек, тогда как у студентов-мужчин его количество было большим на 170–200 мг. Ориентировочное содержание кальция в волосах от 200,0 до 2000,0 мг/кг, стронция – 0,5–5,0 мг/кг [4], бария – 0,4–2,0 мг/кг [3]). Таким образом, полученные результаты указывают на избыточное содержание стронция и бария в волосах обоих гендерных групп студентов и относительно нормальное количество кальция в их волосах. При курении количество кальция и особенно стронция у мужчин снижено (рис. 1).

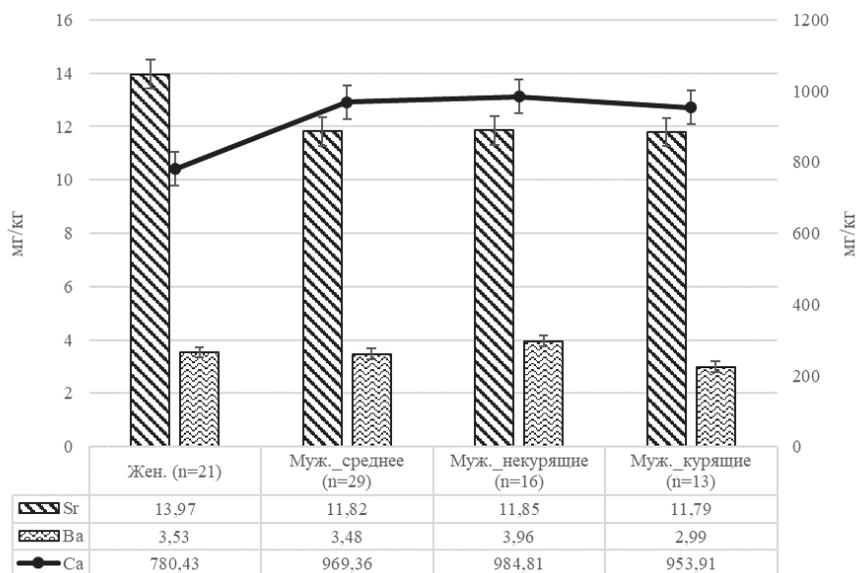


Рис. 1. Среднее содержание ионов щелочноземельных металлов в волосах

Анализ результатов по накоплению микроэлементов выявил значимые отличия в разных сравниваемых группах (рис. 2). Максимум меди отмечался в волосах девушек (2,90 мг/кг), что в 3,7 раза больше, чем в среднем у юношей. Существенных отличий между курящими и некурящими не выявлено. Рекомендуемые показатели по этому микроэлементу в волосах 8–12 мг/кг [5], и в условиях Читы он существенно меньшим. Среди курящих и некурящих студентов по меди отличий не отмечено (см. рис. 2).

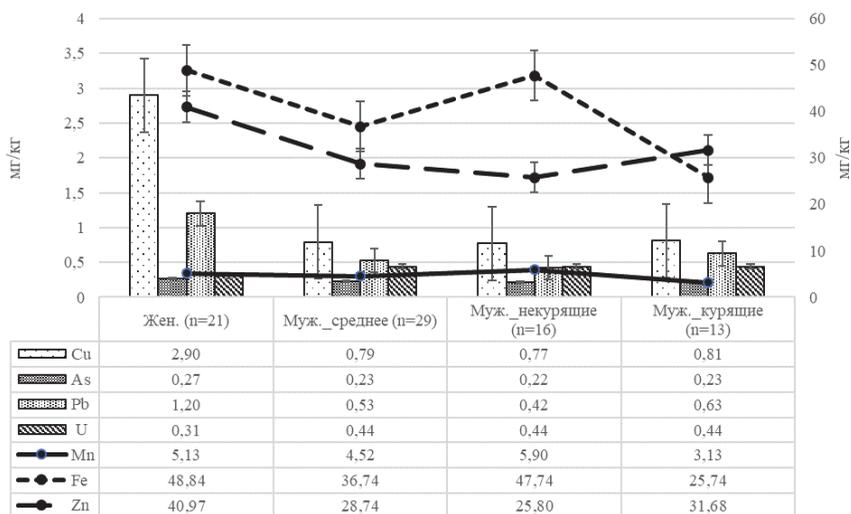


Рис. 2. Среднее содержание микроэлементов в волосах

По мышьяку девушки и юноши не имели значимых отличий в содержании микроэлемента, а также его количество не превышало рекомендованного уровня, который по одним источникам составляет в менее 1,0 мг/кг [5], а по другим – 0,1–0,3 мг/кг [3].

Уровень аккумуляции свинца был максимален в волосах девушек, хотя курящих в этой гендерной группе отсутствовали (см. рис. 2). Накопление микроэлемента в студенток было в более чем в 2 раза большим, по сравнению с юношами. Курящие мужчины имели также повышенный уровень свинца в волосах. Однако ни в одной из проб не был превышен рекомендованный уровень свинца в волосах, который составляет менее 5 мг/кг [5] или 2,0–20,0 мг/кг [3].

Накопление урана интенсивнее происходило у юношей и было в 1,44 раза большим, чем у девушек. Рекомендованный уровень урана в волосах – 0,015–0,3 мг/кг [2], таким образом у юношей этого микроэлемента в волосах было существенно больше.

Распределение марганца по гендерным группам имело существенные различия, и в среднем у девушек этого микроэлемента было больше. Однако у курящих юношей фиксировались минимальные уровни марганца в волосах, тогда как некурящие студенты имели максимальные концентрации этого жизненно важного микроэлемента (см. рис. 2). Рекомендованный уровень марганца в волосах – 0,25–1,0 мг/кг [5] или 0,5–1,5 мг/кг [3], что указывает на его существенно превышение для всех групп.

Аналогичная ситуация фиксировалась и по распределению железа – у девушек и некурящих юношей его количество было существенно больше, чем у курящих юношей (см. рис. 2). Рекомендованный уровень железа в волосах –

30–60 [3] или 10–20 мг/кг [4], что указывает на интенсивное аккумулятивное накопление микроэлемента в волосах. Так как вода центрального водоснабжения г. Читы характеризуется повышенными концентрациями железа и марганца, то это может быть вероятной причиной их избыточного поступления в волосы студентов.

По количеству цинка в волосах максимум зафиксирован в волосах девушек, при этом некурящие юноши имели минимальный уровень накопления цинка в волосах (см. рис. 2). Рекомендованный уровень цинка в волосах – 180–230 мг/кг [5], что указывает на дефицит этого микроэлемента.

Выводы. По большинству исследованных макро- и микроэлементов существенных отличий в накоплении в волосах юношей и девушек не выявлено. По стронцию, меди, свинцу и железу у девушек фиксировалось их большие количества в волосах, что может быть обусловлено медленным обновлением волос из-за причёсок, в которых длина волос существенно больше, чем у юношей. По железу и марганцу повышенные уровни их накопления могут быть обусловлены химическим составом воды, обогащенной этими микроэлементами.

Научный руководитель: к. б. н., доцент Бондаревич Е. А.

Список литературы

1. Определение элементного гомеостаза детского населения Забайкальского края методом многоэлементного инструментального нейтронно-активационного анализа / Л. А. Михайлова, Н. В. Барановская, Е. А. Бондаревич, Ю. А. Витковский, Л. В. Жорняк, Е. С. Эпова, О. В. Ерёмин, Б. В. Нимаева, Е. В. Агеева // Гигиена и санитария. 2023. Т. 102, № 2. С. 197–205. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-2-197-205>
2. Наркович Д. В., Барановская Н. В. Накопление урана в волосах человека под действием техногенных факторов // Радиоактивность и радиоактивные элементы в среде обитания человека : материалы V Междунар. конф. Томск, 13–16 сент. 2016 г. Томск : СТТ, 2016. С. 457–460.
3. Панченко Л. Ф., Маев И. В., Гуревич К. Г. Клиническая биохимия микроэлементов. М. : ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2004. 363 с.
4. Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М. : ОНИКС 21 век, 2004. 216 с.
5. Элементный статус населения России. Т. 4. / Л. И. Афтанас [и др.]. СПб. : Медкнига «ЭЛБИ-СПб», 2013. 576 с.

УДК 574.24

БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭПИДЕРМАЛЬНОЙ СЛИЗИ РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ, ВЫРАЩЕННОЙ В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА

Н. А. Чечкова

*Петрозаводский государственный университет, г. Петрозаводск, Россия
tche4kova.natalia@yandex.ru*

The paper presents the results of a comparative analysis of the bactericidal activity of the mucus of the skin of rainbow trout grown in cage fish farming and a recirculating water supply system.

В настоящее время одной из наиболее перспективных и экономически выгодных форм индустриального выращивания рыбы является искусственное воспроизводство, которое эффективно реализуется как в условиях садкового рыбоводства, так и в установках замкнутого водоснабжения. Как правило, садковые модули располагаются на водоёмах с благоприятными для жизни рыб естественными условиями, включающими в себя гидрологические, гидрохимические и гидробиологические параметры. В связи с экологическими ограничениями, направленными на минимализацию загрязнений от рыбоводных хозяйств, всё активнее развиваются и внедряются в процесс выращивания рыбы установки замкнутого водоснабжения (УЗВ). Основными достоинствами УЗВ служат возможность рециркуляции воды, которая обеспечивает более высокое и стабильное производство продукции аквакультуры с меньшим риском возникновения болезней, а также автоматизированный контроль технологических параметров, влияющих на рост и развитие рыбы. Для диагностики функционального состояния рыбы в условиях искусственного воспроизводства применяются различные физиологические параметры, из которых к одним из наиболее чувствительных к неблагоприятным факторам окружающей среды, относят показатели естественной резистентности. Естественная резистентность включает целый комплекс механизмов клеточной и гуморальной природы, а также анатомо-физиологический барьер, который обеспечивает физико-химическую защиту организма от проникновения патогенов и последующего развития инфекционного процесса. Дополнительным защитным барьером рыб является слизь, бактерицидный эффект которой связан с обнаруженными в ней лизоцимом, гетерогемагглютинидами, комплементом и С-реактивным протеином [1].

Цель данного исследования заключалась в изучении бактерицидной активности эпидермальной слизи радужной форели, выращенной в садках и УЗВ. Для исследования были отобраны 28 особей радужной форели в возрасте 1+ (10 из садков и 18 из УЗВ). В условиях строгой асептики, слизь с поверхности тела рыб отбирали ватными тампонами с последующим приготвлением экстрактов [2]. В этот же день выполняли оценку оптической плотности экстрактов слизи на концентрационном фотозлектроколориметре «КФК-2» при зелёном светофильтре в области спектра 540 нм. Далее после 3 ч инкубации экс-

трактов в термостате при 37 ± 1 °С проводили повторное измерение оптической плотности. Индекс бактерицидности слизи рассчитывали, как соотношение оптической плотности реакционной смеси после 3-часовой инкубации к стартовому значению, выраженное в процентах. Все результаты обрабатывали статистически на базе программы Microsoft Office Excel. Результаты эксперимента по изучению бактерицидной активности эпидермальной слизи радужной форели, выращенной в садках, отображены на точечной диаграмме (рис. 1). Средние значения индекса бактерицидности слизи форели данной группы соответствовали 47,2 %, минимальные – 24 %, максимальные – 72,9 %.

Результаты бактерицидной активности слизи, отобранной с поверхности тела радужной форели, выращенной в УЗВ отображены на рис. 2. Средние значения индекса бактерицидности слизи форели, выращенной в УЗВ соответствовали 73 %, минимальные – 45,2 %, максимальные – 96,9 %. Полученные данные оказались в 1,7 раз выше по сравнению с аналогичными значениями бактерицидной активности эпидермальной слизи радужной форели, выращенной в садках.

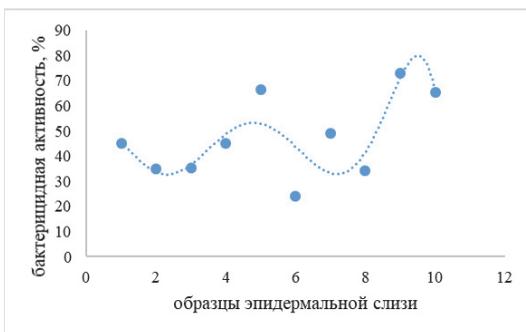


Рис. 1. Бактерицидная активность эпидермальной слизи радужной форели, выращенной в садках

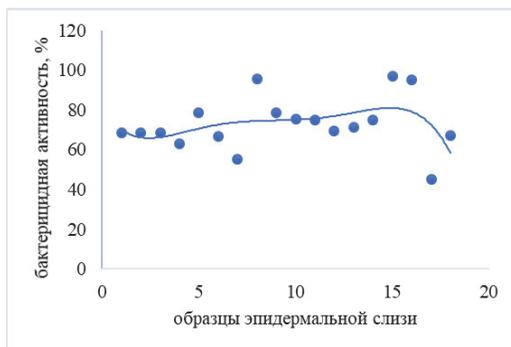


Рис. 2. Бактерицидная активность эпидермальной слизи радужной форели, выращенной в УЗВ

Благодаря выполненному сравнительному анализу бактерицидной активности слизи двух групп радужной форели, выращенной в садках и УЗВ, установлено превышение исследуемого показателя естественной резистентности форели в УЗВ. На основании полученных данных можно предположить, что технологические условия искусственного воспроизводства в УЗВ являются более благоприятной средой для форели, по сравнению с выращиванием рыбы в садках.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026), проводимого совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

Список литературы

1. Лебедева Н. Е. Слизь рыб – индикаторная система их физиологического статуса // Рыбное хозяйство. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре: аналитическая и реферативная информация. М. : ВНИЭРХ, 2001 Т. 2, С. 1–23.
2. Subramanian S., Ross N. W., MacKinnon S. L. // Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2008. N 150(1). P. 85–92.

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

УДК 579.6:663.18

ТЕХНОЛОГИЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Д. С. Белоусов, Ю. А. Малков, Л. А. Беловежц

*Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Россия
belousov_off@mail.ru*

The higher basidiomycetes are the most active decomposers of plant polymers and are of the greatest practical importance. In particular, basidial fungi are especially demanded in the technology of processing waste from the forestry and wood processing industries. The work deals with the technology of submerged cultivation of higher basidiomycetes, which allows obtaining fungal biomass in large quantities.

По данным FAOSTAT за 2019–2021 гг. на лесопромышленных комплексах и деревоперерабатывающих комбинатах России ежегодно образуется свыше 22 млн м³ древесных отходов [3]. Из-за невысокой востребованности отходы лесного хозяйства накапливаются в огромном количестве. Такие отходы создают высокий уровень негативного воздействия на окружающую среду, выделяя в почву и грунтовые воды продукты разложения в большом количестве (фенолы, кислоты). А также за счет способности к самовозгоранию они создают высокую пожароопасность. Таким образом, утилизация отходов лесопиления является одной из важных экологических проблем.

Перспективным направлением по утилизации и обезвреживанию древесных отходов является развитие биотехнологии аэробного и анаэробного биотермического компостирования, при использовании которого отходы органического происхождения обезвреживаются и превращаются в ценное органическое удобрение (биогумус, компост).

Наиболее активными деструкторами растительных полимеров и имеющими наибольшее практическое значение являются высшие базидиомицеты. Такие грибы, как *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*), *Trametes versicolor*, способны разлагать все компоненты растительной массы, что обусловлено синтезом ими большого набора гидролитических и окислительных ферментов, а также высокой проникающей способностью мицелия в субстрат [2].

В Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского СО РАН разработана технология микробной переработки древесных опилок, с использованием ассоциации непатогенных высших базидиальных грибов [1]. Данная технология позволяет получать комплексное органоминеральное удобрение, которое по своим агрохимическим показателям приближено к верховому торфу.

Для использования данной технологии требуется наращивание большого количества биомассы высших базидиальных грибов. Так в ИрИХ СО РАН совместно с НОЦ «Байкал» была создана установка глубинного культивирования грибов периодического действия. Глубинное культивирование осуществляется в ферментационном аппарате 100 л с рабочим объемом 70 л на питательной

среде следующего состава: глюкоза – 20 г/л, дрожжевой автолизат – 10 г/л, вода водопроводная – 40 л, в течение 7 сут. Температура культивирования 26–37 °С (в зависимости от штамма гриба), начальное значение pH 5,5–5,7, конечное – 4,2–4,5, интенсивность перемешивания 20 об/мин (0,3 м/с). Питательную среду инокулируют посевным материалом в количестве 10 % по объему.

В процессе ферментации происходит ступенчатая аэрация питательной среды стерильным воздухом. В период лаг-фазы расход воздуха составляет 0,15 л/(л*мин), далее в фазе экспоненциального роста расход повышается до 0,3–0,4 л/(л*мин) и в стационарной фазе роста поддерживается в диапазоне 0,6–0,7 л/(л*мин). Такая аэрация позволяет контролировать образование пены и уменьшает энергетические затраты.

На данный момент достигнута производительность установки – 500–800 г абсолютно сухих грибов в месяц, что достаточно для компостирования до 1000 м³ опилок.

Список литературы

1. Патент № 2701942 Российская Федерация, МПК C05F 11/08 (2006.01), C05F 11/08 (2019.08). Способ утилизации древесных опилок с применением композиции дерево-разрушающих микроорганизмов для получения комплексного органико-минерального удобрения: № 2019103074: заявл. 05.02.2019; опубл. 02.10.2019 / Беловежец Л. А. 8 с.
2. Прикладная эковиотехнология : учеб. пособие. В 2 т. Т. 1 / А. Е. Кузнецов [и др.]. 2-е изд. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. 629 с.
3. FAOSTAT. URL: <https://www.fao.org/faostat/ru/#data/FO> (дата обращения: 22.08.2023).

УДК 664.8.035.7

ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА НА ХРАНЕНИЕ КОНДИТЕРСКОГО КРЕМА

С. А. Верхотурова, Т. С. Лозовая, О. В. Куприна

*Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Россия
20verkhoturovasofa02@mail.ru*

Conducting research of the dihydroquercetin (DHQ) effect on the processes occurring in the confectionery cream during storage. Determination of the shelf life of the confectionery cream sample with the addition of DHQ.

Для продления сроков хранения при производстве кондитерских изделий с кремом широко используются различные способы, например, заморозка кондитерских изделий, применение консервантов, таких как сорбиновая или бензойная кислота, а также природных антиоксидантов лекарственного сырья и продуктов их переработки (смеси молочных продуктов, полисахаридов, экстрактов лекарственных трав и др.) [1; 2]. Однако данные методы имеют такие недостатки, как возможное появление аллергических реакций у потребителей, изменение структуры продукта после дефростации (заморозки), к тому же, для применения технологии замораживания необходимо применение специального оборудования, что в результате приводит к дополнительному расходу энергоресурсов [3; 4].

Как альтернативу существующим способам продления сроков хранения кондитерского крема стоит рассмотреть применение дигидрокверцетина (ДКВ). В пищевой промышленности ДКВ применяется в основном как сильный антиоксидант: его вносят в животные жиры, растительные масла, молочные продукты и некоторые кондитерские изделия [5]. Внесение ДКВ продлевает срок годности пищевых продуктов в 2–3 раза, улучшает их качество за счёт снижения содержания продуктов окисления, положительно влияет на организм человека [6; 7].

В связи с этим целью работы было выяснить, как ДКВ влияет на продолжительность хранения сливочного крема, изготовленного по традиционной технологии. В ходе проведения исследований готовили образцы сливочного крема: контрольный и опытный. В опытный образец вносили ДКВ в концентрации 0,25 %. Хранили образцы согласно ГОСТ 10-060-95 «Торты и пирожные. Технические условия» [8]. Анализ образцов крема проводили на 0-е, 2-е, 9-е, 16-е и 23-е сут. При этом проводили органолептическую оценку крема, определение массовой доли жира, кислотного и перекисного числа, КМАФАнМ. Результаты исследования отражены на рис. 1–4.

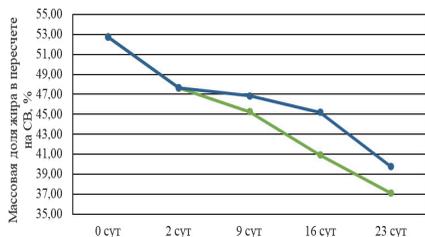


Рис. 1. Изменение массовой доли жира в пересчете на СВ в процессе хранения



Рис. 2. Изменение перекисного числа в процессе хранения



Рис. 3. Изменение кислотного числа в процессе хранения



Рис. 4. Изменение КМАФАнМ в процессе хранения

— Контрольный образец — Опытный образец

Было выявлено, что добавление ДКВ положительно влияет на органолептику сливочного крема при хранении, снижает количество перекисей и свободных жирных кислот (в 2,5 и в 1,6 раз соответственно); замедляет скорость окисления жиров; замедляет рост микроорганизмов (в 1,2 раза), позволяет продлить срок хранения кондитерского крема с 36 ч до 100 ч. То есть ДКВ является перспективным консервантом для кондитерских изделий с кремом.

Список литературы

1. Головачева А. В. Разработка технологии сбивных кондитерских изделий с использованием пищевых волокон и лекарственных трав : дис. ... канд. техн. наук. М., 2011. 164 с.
2. Челомбитко М. А., Кандымов А. В., Акулова Т. Н. Шоковая заморозка – современное направление в производстве хлебобулочных и кондитерских изделий // Переработка и управление качеством сельскохозяйственной продукции : сб. ст. II Междунар. науч.-практ. конф. Минск, 26–27 марта 2015 г. Минск: БГАТУ. 2015. С. 35–38.
3. Типсина Н. Н., Батура Н. Г., Гуркаева Г. Г. Влияние замораживания на потребительские свойства тортов // Вестник КрасГАУ. 2019. №10. С. 175–180.
4. Дьяченко Ю. А. Оценка содержания сорбиновой кислоты в рационах питания старшекласников и студентов и ее влияния на активность панкреатической липазы // Вестник Адыгейского государственного университета. Серия 4, Естественно-математические и технические науки. 2015. № 1(154). С. 49–52.

5. Решетник Е. И. Обоснование и разработка технологии производства пищевых продуктов с применением дигидрокверцетина // Вестник Дальневосточного государственного аграрного университета. 2007. № 1(1). С. 130–132.

6. Кудрявцева Е. Н., Головина А. А. Применение дигидрокверцетина в пищевой промышленности // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. 2018. № 20. С. 269–271.

7. Фомичев Ю. П. Флавоноид – дигидрокверцетин в питании человека, животных, сохранности продукции сельского хозяйства // Эффективное животноводство. 2018. № 4(143). С. 58–60.

8. ОСТ 10-060-95. Торты и пирожные. Технические условия. Введ. 1995-05-01. Департамент пищевой и перерабатывающей промышленности Минсельхозпрода РФ. 1995. 16 с.

УДК 579.66

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОСАДКОВ, ПОДВЕРГАЕМЫХ АНТРОПОГЕННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ

А. Л. Герасимчук¹, Ю. А. Франк^{1,2}, П. А. Бухтиярова¹,
Д. А. Ивасенко^{1,2}

¹Томский государственный университет, г. Томск, Россия

²ООО «Дарвин», г. Томск, Россия
gerasimchuk_ann@mail.ru

This study is aimed to search for microorganisms able to degrade complex organic substances such as lipids. The sample of the sediments collected from the Amba River polluted with swine sewage near Kolyvan settlement, Novosibirsk region, Russia, was used to isolate pure cultures. Our results together with the published data indicate that three isolates, *P. veronii* sp. KNov-fat-3.2, *B. flexa* sp. KNov-fat-1.2 and *S. surfactantfaciens* sp. KNov-glic-T, are the most promising strains for the production of lipolytic enzymes and can be applied in biotechnologies.

Загрязнение окружающей среды промышленными органическими отходами представляет глобальную проблему и поиск новых эффективных и безопасных технологий очистки представляет большую практическую значимость. Подходы микробного разложения (биоремедиации) для разного вида органических отходов имеют такие преимущества, как более низкая стоимость и меньшее количество вторичного загрязнения, а также простота эксплуатации и обслуживания [1]. Хотя многие бактерии способны метаболизировать органические загрязнители, ни одна бактерия не обладает ферментативной способностью разлагать все или даже большинство органических соединений в загрязненных местообитаниях. Смешанные микробные сообщества обладают наиболее мощным биотехнологическим потенциалом [2]. В связи с этим актуальным остается поиск новых штаммов-продуцентов промышленно значимых ферментов и разработка консорциумов для деструкции разных типов отходов. Источниками новых микроорганизмов-продуцентов могут служить загрязненные отходами почвы, донные отложения и водные объекты.

Целью исследования явился поиск микроорганизмов-деструкторов сложных органических веществ из загрязненных органическими отходами природных осадков, собранных на правом берегу р. Амба вблизи пос. Колывань Новосибирской области, Россия. Санитарно-микробиологический анализ проб воды вблизи места отбора осадков с использованием классического подхода по определению численности энтеро- и колиформных бактерий обнаружил в исследованной воде до 60 КОЕ/мл энтеробактерий и до 50 КОЕ/мл колиформных бактерий, что в 10 раз превышает санитарные показатели (СанПиН 2.1.5.980–00) и указывает на загрязнение воды органическими субстанциями.

Для подтверждения присутствия в исследуемых образцах промышленно-значимых микроорганизмов был проведен молекулярный анализ по поиску генов, кодирующих ферменты для деградации органического вещества, а именно

липаз и целлюлаз. ДНК из загрязненных осадков выделяли с помощью коммерческого набора реактивов HiPure Soil DNA Kit (Magen, Китай). Амплификацию фрагментов генов липаз проводили с праймерами OXF1/ACR1 и OXF1/ACR3 [3], генов целлюлаз – с использованием пар праймеров cel48_490F и cel48_920R [4], а также GH48degF и GH48degR [5]. В результате со всеми вариантами праймеров получены фрагменты ожидаемой длины, а именно около 400 п. о. для фрагментов предполагаемых генов целлюлаз и около 250 п. о. для предполагаемых генов липаз. Эти данные свидетельствуют о том, что в исследуемом образце осадков могут присутствовать микроорганизмы-продуценты промышленно значимых ферментов, способных к деградации сложных органических соединений.

Для выделения штаммов-деструкторов применяли подход селективного культивирования с использованием питательных сред для липофильных микроорганизмов, как описано ранее [6]. Всего было выделено более 20 изолятов, из них отобрано для дальнейших исследований 10 штаммов, которые продемонстрировали липолитическую активность на диагностической среде с 1 % трибутирином. Определение филогенетического положения полученных бактериальных штаммов проводили с помощью секвенирования и анализа последовательностей генов 16S рРНК. Геномную ДНК из культур выделяли с помощью набора DU от Biolabmix (Новосибирск, Россия) в соответствии с инструкцией производителя (<http://biolabmix.ru/>). Для амплификации бактериальных генов 16S рРНК использовали стандартные праймеры 27F и 1492R. Состав ПЦР-смеси и режим амплификации описаны нами ранее [6]. Филогенетический анализ отнес выделенные штаммы к представителям гаммапротеобактерий *Pseudomonas*, *Serratia*, *Rhahella* и фирмикут *Domibacillus* и *Bacillus*.

Помимо липолитической активности на диагностической среде, штаммы культивировали на синтетической среде с добавлением 1 % свиного жира. Единственным штаммом, продемонстрировавшим рост с животным жиром в качестве единственного источника углерода и образование многочисленных колонии по всей поверхности чашки Петри менее, чем через 5 сут от начала культивирования, был штамм *Bacillus flexa* sp. KNov-fat-1.2. На основе полученных результатов и анализа литературных данных о близкородственных видах можно прийти к заключению, что штаммы *P. veronii* sp. KNov-fat-3.2, *B. flexa* sp. KNov-fat-1.2, *S. surfactantfaciens* sp. KNov-glic-T являются наиболее перспективными штаммами для деструкции органического вещества и продукции липолитических ферментов. Штамм *S. fonticola* sp. KNov-glic-1 может быть использован для разработки биопрепарата, оказывающего стимулирующее влияние на рост растений, так как для родственных нашему штамму представителей *Serratia* известны стимулирующие рост растений свойства [7; 8].

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWM-2020-0019).

Список литературы

1. Megharaj M. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective / M. Megharaj [et al.] // *Environ Int.* 2011. Vol. 37(8). P. 1362–1375.
2. Fritsche W., Hofrichter M. Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms, in *environmental biotechnology: Concepts and applications*. Eds H.-J. Jördening and J. Winter. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2005.
3. Prospecting for novel lipase genes using PCR / Bell P. J. L., Sunna A., Gibbs M. D., Curach N. C., Nevalainen H. and Bergquist P. L. // *Microbiology*. 2002. Vol. 148. P. 2283–2291.
4. A novel primer mixture for GH48 genes: quantification and identification of truly cellulolytic bacteria in biogas fermenters / Rettenmaier R., Y. K. Lo, L. Schmidt, B. Munk, I. Lagkouravdos, K. Neuhaus, W. Schwarz, W. Liebl and V. Zverlov // *Microorganisms*. 2020. Vol. 8. P. 1297.
5. Genetic diversity detection and gene discovery of novel glycoside hydrolase family 48 from soil environmental genomic DNA / Hua M. [et al.] // *Ann Microbiol.* 2018. Vol. 68. P. 163–174.
6. Селективное культивирование бактериальных штаммов с липолитической и нефте-окисляющей активностью из донных осадков реки Оби в Западной Сибири / А. Л. Герасимчук, Д. А. Ивасенко, А. А. Касимова, Ю. А. Франк // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022. Т. 26, № 5. С. 449–457.
7. Devi U. Draft genome sequence of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia fonticola* strain AU-P3(3) / U. Devi [et al.] // *Genome announc.* 2013. Vol. 1.
8. Koo S. Y., Cho K. S. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5 // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 19. P. 1431–1438.

УДК 579.6

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *TRICHODERMA VIRIDE* НА ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ ОТХОДАХ СО СВАЛОК ПРЕДПРИЯТИЯ АО «ГРУППА ИЛИМ»

И. С. Драница, М. С. Подсохин, А. А. Приставка, Г. В. Юринова,
В. Л. Михайленко

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
dranitsa. irina@mail.ru*

The possibility of using the fungus *Trichoderma viride* for the disposal of stale bark and wood waste generated at pulp and paper industry enterprises has been shown.

Россия является одной из ведущих стран мира по объему заготавливаемой древесины. В связи с этим возникает проблема накопления большого количества отходов ЛПК и деревообрабатывающей промышленности. На территории Прибайкалья большое количество лигноцеллюлозных отходов образуется в результате деятельности Братского лесопромышленного комплекса и Усть-Илимского целлюлозно-бумажного комбината. Существующие традиционные способы утилизации накапливающихся свалочных материалов либо экономически нецелесообразны, либо небезопасны по экологическим показателям. Ситуация осложняется тем, что эти отходы содержат большую долю коры и загрязнены органическими (нефтепродукты) и неорганическими (тяжелые металлы) компонентами. Альтернативным способом безопасной утилизации лигноцеллюлозы является их биотехнологическая переработка с использованием деструктурирующих микроорганизмов. Одним из наиболее перспективных продуцентов являются грибы рода *Trichoderma*, которые обладают наиболее сбалансированным целлюлазным комплексом и способны эффективно разлагать как нативную, так и модифицированную целлюлозу [1]. Однако неизвестно, в какой степени эти микроорганизмы смогут взаимодействовать с субстратом, который имеет пониженное соотношение древесины/кора, и который накапливался длительное время в присутствии углеводородного загрязнения.

Цель работы: изучить возможность использования грибов рода *Trichoderma* для утилизации лежалых кородревесных отходов, загрязненных нефтепродуктами.

Объекты и методы исследования.

1. Кородревесные отходы с несанкционированной свалки предприятия АО «Группа Илим», рН $8,27 \pm 0,23$; массовая доля углеводов (экстракция гексаном) – 0,4 %, массовая доля водорастворимых экстрактивных веществ – $2,65 \pm 1,1$ %.

2. *Trichoderma viride* из коллекции кафедры физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики. Гриб культивировали на жидкой среде Чапека, в которую добавляли исследуемый субстрат в разных количествах: 1, 3 и 10 % (а. с. в. /W). Продолжительность культивирования составила 10 сут. В

процессе культивирования в культуральной жидкости измерялись общая целлюлазная активность (методом Шомоди – Нельсона), содержание внеклеточного белка и грибная биомасса.

3. Ферментный препарат «Целлловиридин ГЗх» (Москва). Кроме серии экспериментов *in vivo*, лигноцеллюлозный субстрат обрабатывали *in vitro* промышленным препаратом «Целлловиридин ГЗх» на основе целлюлазного комплекса *T. viride*. Реакционная смесь включала: 10 % субстрат (W/V), буферный раствор (рН 4,6), ферментный препарат – 2 МЕ на г субстрата. Реакционная смесь термостатировалась при 40 °С в течение 4 сут, периодически в жидкой фазе измерялось содержание сахаров и остаточная целлюлазная активность. В качестве контрольного субстрата в обеих сериях экспериментов использовали свежие сосновые опилки.

Результаты

При глубинном культивировании *T. viride* в присутствии свалочного материала в количестве 1 и 3 % наблюдалось увеличение (относительно контрольных сред) всех показателей: общая целлюлазная активность – в 18 ± 3 раз; концентрация внеклеточного белка – в $7 \pm 1,5$ раз; биомассы гриба – $1,2 \pm 0,1$ раза. За 10 сут культивирования снижение массы субстрата составило $1,4 \pm 0,1$ %. При культивировании в условиях более высокой плотности субстрата (10 %) общая целлюлазная активность снизилась до контрольных значений, вероятно, за счет адсорбции большей части фермента на субстрате, но при этом в два раза увеличилось количество утилизированного субстрата – до $3 \pm 0,1$ %.

В эксперименте *in vitro* скорость образования восстанавливающих групп на стационарном участке кинетической кривой в среде с контрольным субстратом (свежие опилки) была в 3,5 раза выше, чем в случае с исследуемым образцом (рис. 1, а). Кроме этого, фермент быстрее сорбируется на контрольном субстрате – через 6 ч в жидкой фазе остается менее 50 % свободного фермента, а в среде с исследуемым образцом – более 95 % ферментативной активности (рис. 1, б). Чтобы осуществлять гидролиз субстрата, целлюлазы должны на нем предварительно адсорбироваться, поэтому выявленные эффекты указывают на существование каких-то факторов, препятствующих физическому контакту фермента и кордревесного субстрата. Возможно, что так проявляется влияние углеводов, которые делают поверхность субстрата более гидрофобной и таким образом проявляют свойства ингибитора.

Однако, даже несмотря на присутствие в загрязнённом субстрате ингибиторов, за 96 ч он подвергся более глубокой деструкции: фермент-опосредованное снижение веса составило более 15 %, в то время как для нативного (контрольного) субстрата – всего 3 %.

Таким образом, наличие загрязняющих веществ и большая доля коры в исследуемом образце не является препятствием для его утилизации дереворазрушающими грибами. Даже при высокой концентрации этого субстрата (10 %) рост *T. viride* не отличается от роста на контрольных питательных средах, при этом происходит частичная утилизация этого субстрата. Ферментный препарат на основе целлюлазного комплекса из грибов также способен взаимодейство-

вать со свалочным материалом: несмотря на то, что кинетика адсорбции фермента на нем и динамика накопления продуктов гидролиза имеют отличительные особенности, итоговая эффективность гидролиза оказалась в разы выше, чем для нативного субстрата.

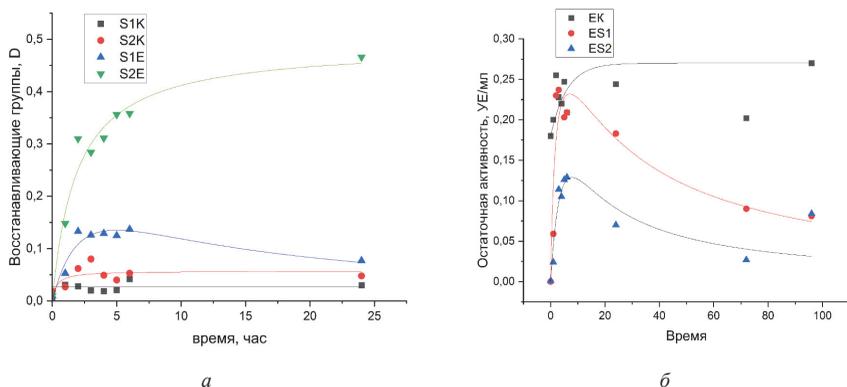


Рис. 1. Кинетические параметры гидролиза опытного и контрольного лигноцеллюлозных субстратов препаратом Целловиридин ГЗх. а) динамика накопления восстанавливающих сахаров в растворах; б) динамика остаточной целлюлазной активности в жидкой фазе реакционной среды. S1 – кородревесные отходы, S2 – контрольный субстрат (свежие опилки); К – контрольные среды без фермента; Е – опытные среды, содержащие ферментный препарат; ЕК – контрольная среда по ферменту без субстрата; ES1 – реакционная среда с исследуемым субстратом; ES2 – среда с контрольным субстратом

Список литературы

1. Fungal Cellulases / С. М. Payne [et al.] // Chemical Reviews. 2015. Vol. 115, N 3. P. 1308–1448. DOI: 10.1021/cr500351c

УДК 577.2+595.36

ПРОТЕОМ ГЕМОЦИТОВ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД ВИДА *EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS*

**Е. Д. Золотовская, А. А. Назарова, А. Д. Власевская,
П. Б. Дроздова, М. А. Тимофеев**

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
zolotovskayaelenad@gmail.com*

In this study we obtained the first hemocyte proteome of an amphipod, using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). We discovered proteins directly involved in the immune response such as pattern recognition proteins (C-type lectins), as well as compounds with antimicrobial activity (ctenidin and anti-lipopolysaccharide factor/scygonadin).

Защита от воздействия паразитов или инородных тел, обеспеченная иммунным ответом, является важным аспектом жизнедеятельности любого организма. Ракообразные, как и большинство беспозвоночных, обладают врожденным иммунитетом, который во многом зависит от гемолимфы. Иммунные компоненты гемолимфы условно разделяют на клеточные (гемоциты) и гуморальные (вещества, циркулирующие в плазме гемолимфы). Все компоненты тесно связаны друг с другом; например, соединения, участвующие в гуморальном иммунном ответе, могут секретироваться гемоцитами в ответ на инородное тело. Помимо секреции, гемоциты выполняют такие функции, как инкапсуляция инородных объектов; дегрануляция и активация процесса меланизации [3]. Однако молекулярные процессы, лежащие в основе функционирования гемоцитов, у байкальских эндемичных амфипод остаются неизученными.

Работа была посвящена изучению белкового состава гемоцитов у байкальских амфипод вида *Eulimnogammarus verrucosus*.

Амфипод отлавливали в прибрежной зоне оз. Байкал в районе пос. Листвянка. В лаборатории животных акклимировали в аэрируемых аквариумах при температуре 6 °С в течение 4 сут. Гемолимфу отбирали, с последующей очисткой гемоцитов по методике, описанной ранее в статье Shcharova et al. [4]. Выделение белка выполняли, как описано у Bedulina et al. [1] с модификациями.

Протеом гемоцитов оценивали с применением жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). LC-MS/MS-анализ белков гемоцитов проводили в Центре коллективного пользования “Передовая масс-спектрометрия” Сколковского института науки и технологий. Данные анализировали с использованием программного обеспечения SearchGUI v3.3.17 и Peptide Shaker v1.16.44. Идентификацию белков проводили с использованием базы данных на основе сборки транскриптома *E. verrucosus* GHHK01 [2]. Предсказание трансмембранных доменов проводили с помощью TMHMM v2.

Для охарактеризации протеома гемоцитов мы проанализировали два белковых образца, один из которых был очищен с использованием 0,2 % додецилсульфата натрия (SDS) для повышения эффективности экстракции мембранных белков. Каждый образец был проанализирован в трех технических повторях. Общее количество идентифицированных белков варьировало от 697 до 878 последовательностей на образец. Всего было обнаружено 1152 белка, из которых 431 был идентифицирован во всех шести технических повторях. При этом количество белков с предсказанными трансмембранными доменами оказалось почти в два раза выше в образце, с добавлением SDS.

Для изучения разнообразия белков гемоцитов идентифицированные последовательности аннотировали, используя базу данных Panther, и затем ранжировали по встречаемости от самых распространенных до наименее распространенных в протеоме (рис. 1). В наибольшем количестве содержались белки семейства личиночных запасных белков/фенолоксидазы (larval storage protein/phenoloxidase) – в среднем около 13,6 % от всех белков. Белки цитоскелета тубулин и актин по количеству были вторым (2,0 %) и четвертым (1,6 %) месте, соответственно. Кроме того, на третьем (1,7 %) месте по распространённости составили белки, принадлежащие к суперсемейству лектинов С-типа (C-type lectin), которые, вероятно, участвуют в распознавании молекулярных паттернов чужеродных микроорганизмов. Для получения подробной информации о функционировании этих белков в организме амфипод, была создана векторная конструкция, содержащая ген потенциального лектина С-типа GNNK01014723, необходимая для последующего изучения свойств белка в клетках *S2 Drosophila melanogaster*. Помимо лектинов, также были обнаружены другие белки, участвующие в иммунном ответе, а именно интегрины, супероксиддисмутаза, сквенджер-рецепторы (scavenger receptors) и антимикробные пептиды.

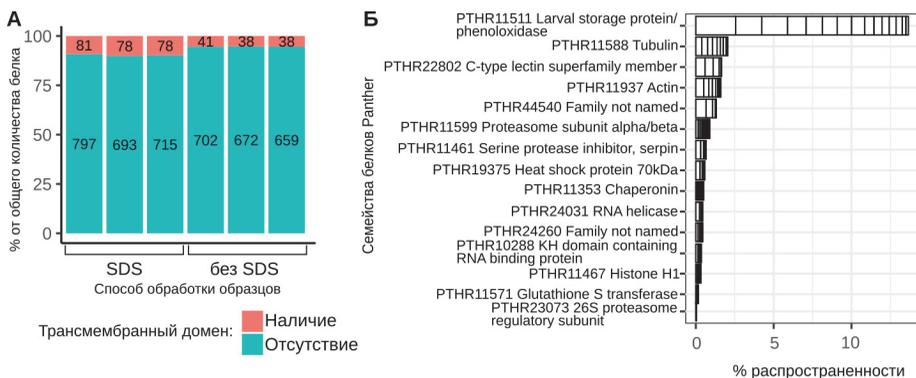


Рис. 1. Разнообразие белков в протеоме гемоцитов *Eulimnogammarus verrucosus*. А – общее количество идентифицированных белков в каждом из 6 образцов. Б – основные группы белков в протеоме гемоцитов. Каждый прямоугольник соответствует одному предсказанному белку; ширина прямоугольника пропорциональна его распространенности в протеоме

Таким образом, был впервые проанализирован протеом гемоцитов амфипод на примере байкальского эндемичного вида *E. verrucosus* и идентифицированы белки, которые прямоили косвенно участвуют в иммунном ответе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Госзадания FZZE-2020- 0026.

Список литературы

1. Preliminary analysis of hemocyanins in hemolymph plasma of Baikal endemic amphipods / D. S. Bedulina, A. N. Gurkov, B. K. Baduev, E. V. Borvinskaya, M. D. Dimova, M. A. Timofeyev // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2016. Vol. 12, N 1. P. 74–86
2. Comparison between transcriptomic responses to short-term stress exposures of a common Holarctic and endemic Lake Baikal amphipods / P. Drozdova, L. Rivarola-Duarte, D. Bedulina, D. Axenov-Gribanov, S. Schreiber, A. Gurkov, Z. Shatilina, K. Vereshchagina, Y. Lubyaga, E. Madyarova, C. Otto, F. Jühling, W. Busch, L. Jakob, M. Lucassen, F. J. Sartoris, J. Hackermüller, S. Hoffmann, H. O. Pörtner, T. Luckenbach, M. Timofeyev, P. F. Stadler // BMC Genomics. 2019. Vol. 20, N 1. P. 1–14.
3. Rowley A. F. The Immune system of crustacean // Encyclopedia of immunobiology. Academic Press, Elsevier, 2016. N 1. P. 437–453.
4. Application of PEG-Covered non-biodegradable polyelectrolyte microcapsules in the crustacean circulatory system on the example of the amphipod *Eulimnogammarus verrucosus* / E. Shchapova, A. Nazarova, A. Gurkov, E. Borvinskaya, Y. Rzhchitskiy, I. Dmitriev, I. Meglinski, M. Timofeyev // Polymers. 2019. Vol. 11, N 8. P. 1246.

УДК 632.9

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТРИАЗОЛОВ КАК ПРЕСПЕКТИВНЫЕ НЕ-АНТИБИОТИКИ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

**К. И. Киенская, Л. С. Донская, С. К. Бобровницкий,
Е. С. Олейник, И. А. Буторова**

*Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, г. Москва, Россия
МИРЭА – Российский технологический университет
(Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова), г. Москва, Россия
kienskaia.k.i@muctr.ru*

New derivatives of triazole and ribavirin have been synthesized. Ribavirin activity was detected against *Candida albicans* and *Fusarium culmorum*. It has been shown that new triazole derivatives are more active against *Candida albicans* at lower concentrations than ribavirin.

Термин «не-антибиотики» появился не так давно и свидетельствует о том, что противовирусные препараты, используемые в медицине, способны проявлять и антибактериальную активность, а также препятствовать размножению некоторых грибов. Использование таких препаратов в сельском хозяйстве может обеспечить защиту растений от комплекса заболеваний, вызванных как вирусами, так и бактериями, и грибами. Одним из описанных в литературе представителей не-антибиотиков является рибавирин – производное 1,2,4-триазола и рибавирина. Белорусской Академией Наук представлен положительный опыт применения рибавирина и для защиты растений от заболеваний, в частности, чеснока [1; 2].

Авторами настоящей работы условиях *in vitro* изучена противогрибковая активность рибавирина в отношении дрожжей *Candida albicans* ВКПМ-У-3108 и определена его минимальная подавляющая концентрация (МПК), которая составила 10 мг/мл.

Изучена противогрибковая активность рибавирина в отношении фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum*, вызывающего заболевание фасоли. В ходе исследований было установлено, что 3-х кратный полив растений с интервалом 1 раз в 7 дней раствором рибавирина в концентрации 0,4 мг/мл подавлял рост фитопатогенного гриба *Fusarium culmorum* в прикорневой зоне фасоли. При этом в прикорневой зоне фасоли отмечалось также уменьшение общего количества бактериальной микрофлоры, в составе которой могут присутствовать потенциальные патогены (рис. 1).

Несмотря на известный факт о том, что производные триазолов являются эффективными соединениями, обладающими широким спектром биологической активности и находят применения в сельском хозяйстве, синтез новых производных представляет собой актуальную задачу из-за высокой резистентности вредных микроорганизмов к применяемым препаратам и позволяет получить новые молекулы не-антибиотиков.

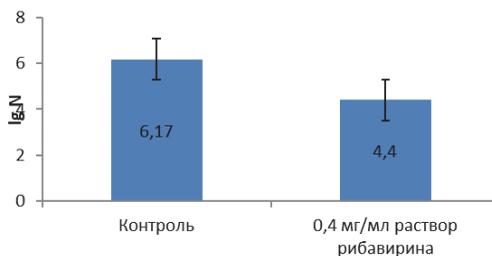


Рис. 1. Общее количество бактериальной микрофлоры в прикорневой зоне фасоли

Были синтезировано несколько производных азолови изучена их противогрибковая активность в отношении дрожжей *Candida albicans* ВКПМ-У-3108 турбидиметрическим методом по степени задержки роста тест-штамма в жидкой питательной среде Сабуро в присутствии исследуемых соединений при измерении оптической плотности выращенных образцов при 36 °С в течение 48 ч на спектрофотометре при λ 540 нм. Концентрация производных триазолов в среде составляла 2,0 мг/мл (табл. 1).

Таблица 1

Оценка антигрибковой активности синтезированных аналогов триазола

Показатели	Образцы			
	Контроль	1	2	3
Рост <i>Candida albicans</i> , ед. оптической плотности	0,813 ±0,28	0,151 ± 0,23	0,290 ±0,31	0,421 ±0,25
Степень ингибирования, %	–	81,4	64,3	48,2
Химические названия		Дигидрохлорид 5-[(1S)-1-амино-3(метилтио)пропил]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	Дигидрохлорид 5-[[1S)-1-амино-2(фенилэтил)пропил]-1,2,4-триазол-3-карбоксамид	5- (тетрагидрофуран-2-ил)-1,2,4-триазол-3-амин
Структурная формула синтезированных соединений				

Таким образом, синтезированные производные триазола проявили противогрибковую активностью в отношении штамма дрожжей *Candida albicans* ВКПМ-У-3108 в значительно меньшей концентрации по сравнению с рибавирином.

Список литературы

1. Киенская К. И., Буторова И. А., Донская Л. С. Новые направления применения рибавирина // Актуальная биотехнология. 2022. №1. С. 93–95.
2. Никонович Т. В., Бреговина И. Г., Скорина В. В. Оздоровление растений-регенератов озимого чеснока в условиях культуры in-vitro при помощи Рибавирина // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии: научно-методический журнал. 2011. № 4. С. 77–81.

УДК 579.61+616.932(471)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСПАРАГИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТАХ БАКТЕРИЙ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ООИ МЕТОДОМ РАДИАЛЬНОЙ ЭНЗИМОДИФУЗИИ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

С. Н. Козлов, Е. Ю. Марков, В. Б. Николаев, Л. Я. Урбанович,
Л. В. Миронова, А. В. Корнева, Е. С. Куликалова

*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири
и Дальнего Востока Роспотребнадзора, г. Иркутск, Россия
e-mail: ejimei@mail.ru*

Asparaginase activity was detected in preparations of cell-free extracts of *V. cholerae*, *F. tularensis*, and *Y. pseudotuberculosis* using radial enzyme diffusion tests in agarose gel with asparagine as a substrate. According to the degree of asparaginase activity, interstrain differences were found.

L-Аспарагиназы (L-аспарагинамидогидролазы, КФ 3.5.1.1) – это ферменты, и катализирующие процесс гидролитического расщепления аминокислоты аспарагина на аспарагиновую кислоту и аммиак. Аспарагиназы широко распространены в природе, обнаружены у многих млекопитающих, птиц, растений, простейших, грибов, бактерий и характеризуются разнообразием структурно-функциональных и биохимических свойств [1–4]. У патогенных для человека микроорганизмов таких как *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli* O157:H7 L-аспарагиназа, входящая в состав шига-подобного токсина, ингибирует пролиферацию Т-клеток, что угнетает иммунный ответ и облегчает проникновение патогена в макроорганизм [5; 6], L-аспарагиназа, секретлируемая *Helicobacter pylori*, подавляет клеточный цикл фибробластов и клеток желудочного эпителия [7]. Подтверждена роль аспарагиназы и в вирулентности *Serratia marcescens* [8]. Установлен её плеiotропный эффект на экспрессию ряда генов, а также способность подавлять формирование биоплёнок многих патогенных микроорганизмов [9]. Известен хороший противоопухолевый эффект препаратов аспарагиназы *E. coli* и *Dickeya didantii* при химиотерапии острого лимфобластного лейкоза и неходжкинских лимфом [10] и *Yersinia pseudotuberculosis* [10]. Данных о наличии и распространённости L-аспарагиназ у холерных вибрионов крайне мало, однако в литературе имеется сообщение о обнаружении L-аспарагиназ у холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп гексанцианоферратовым методом [12]. Есть указания на то, что процессы метаболизма и ассимиляции аспарагина являются критичными для интрацеллюлярного размножения и диссеминации туляремийного микроба [13].

Цель исследования – выявление аспарагиназной активности в бесклеточных фракциях *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп разной эпидемической значимости и происхождения, *Francisella tularensis* разных подвидов, *Yersinia pseudotuberculosis* методом радиальной энзимодиффузии в агарозном геле, содержащем L-аспарагин.

Материалы и методы. В качестве объектов для исследования были взяты препараты мочевиновых экстрактов (МЭ) и супернатанты культуральной жидкости (СКЖ), полученных из штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разной эпидемической значимости и происхождения, мочевиновых экстрактов *F. tularensis* и *Y. pseudotuberculosis*. Препараты МЭ получали из обработанной исходной бактериальной массы стерильным раствором 9 М мочевины в соотношении 1:1. После суточной экспозиции при комнатной температуре проводили бактериологический контроль стерильности полученных лизатов. После положительной проверки на специфическую стерильность материал подвергали фракционированию с помощью дифференциального центрифугирования. Полученный после центрифугирования супернатант (мочевинный экстракт) лиофилизировали. Супернатанты культуральной жидкости холерных вибрионов получали обработкой после пересева с плотной питательной среды бульонной культуры холерных вибрионов 0,01 % раствором мертиолята натрия, проверки её на специфическую стерильность и центрифугирования при 10000 об/мин. Полученный после центрифугирования супернатант диализовали и лиофильно высушивали. Обнаружение L-аспарагиназной активности проводили по методу R. V. Mahajan с соавт. [14], используя 2 % агарозу, 2 % L-аспарагин («Serva») и 0,009 % феноловый красный в качестве индикаторов изменения pH среды, приготовленной на ddH₂O и / или ацетатном буфере pH 4,0. В качестве контроля активности служили чашки Петри с агарозой без субстрата (аспарагина), при этом внутренним отрицательным контролем служили лунки с ddH₂O и инертными белками (фитогемагглютинин). Образцы МЭ и СКЖ наносили в лунки опытной и контрольной сред в объёме 70 мкл с последующей суточной инкубацией в термостате при 37 °С. О наличии аспарагиназной активности судили по изменению цвета вокруг лунок на опытной среде в результате индикатора по сравнению с контрольной средой. Опыты по определению аспарагиназной активности проводили 3-кратно.

Результаты и обсуждение. С помощью RED-тестов в агарозном геле с аспарагином и индикатора фенолового красного установлено наличие аспарагиназной активности у большинства взятых в исследование препаратов МЭ *V. cholerae*, *F. tularensis* и *Y. pseudotuberculosis*. У препаратов МЭ *F. tularensis* 250 и 380, суспендированных в ddH₂O и нанесённых на среду на ddH₂O изменений вокруг лунок не наблюдалось. При проведении этого теста с образцами клеточных оболочек *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп никаких изменений вокруг лунок после инкубации чашек не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии активности и согласуется с данными литературы (т. к. аспарагиназа-периплазматический фермент). Однако при использовании опытной среды и образцов, суспендированных в ацетатном буфере pH 4,0 после суточной инкубации чашек отмечалось изменение среды в виде тёмно-синих ореолов вокруг лунок со всеми опытными образцами, исключая отрицательные контроли. Максимальные размеры зон гидролиза (тёмно-синих ореолов) и интенсивность их окрашивания отмечались у МЭ *V. cholerae* El Tor И-1369, МЭ *V. cholerae* El Tor 140-Б-17 и МЭ *V. cholerae* O139 И-16 и составили 5 мм, у препарата МЭ

V. cholerae М-878 он составил 3,5 мм. У препарата МЭ *F. tularensis* 386 он составил 3,5 мм, у препарата МЭ *Y. pseudotuberculosis* 3704 зона окрашивания была менее интенсивна и её размер составил 3,5 мм. При тестировании образцов и среды, приготовленных на ацетатном буфере рН 4,0 отмечается увеличение зон синего окрашивания среды вокруг лунок до 8 мм. При использовании в качестве индикатора бромтимолового синего в подавляющем большинстве случаев наблюдалось появление синего окрашивания в результате изменения рН на контрольной среде (без аспарагина) и возле контрольных лунок, что свидетельствует о протекании неспецифических реакций и невозможности использовать данный индикатор для обнаружения аспарагиназной активности.

Выводы. Опыты с применением фенолового красного в качестве индикатора изменения рН при определении аспарагиназной активности показали его надёжность и пригодность, с помощью него нами установлено, что аспарагиназная активность обладают препараты МЭ *V. cholerae*, *F. tularensis* и *Y. pseudotuberculosis* аспарагиназной активностью вне зависимости от эпидемиологической значимости и вирулентности исходных штаммов. Использовать для этих целей бромтимоловый синий не рекомендуется ввиду высокой вероятности появления неспецифических реакций и ложноотрицательных/ложноположительных результатов.

Список литературы

1. Brumano L. P., da Silva F. V. S., Costa-Silva T. A. Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018. Vol. 6. Art. 212. P. 1–22.
2. Krishnapura P. R., Belur P. D., Subramanya S. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases // *Crit. Rev. Microbiol.* 2016. Vol. 42, N 5. P. 470–737.
3. Guinea pig serum L-asparaginase: Purification, and immunological relationship to liver L-asparaginase and serum L-asparaginases in other mammals / N. Zhang, F. Clarke, G. Di Trapani, D. Keough, I. Beacham // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 1995. Vol. 112, N 4. P. 607–612. DOI:10.1016/0305-0491(95)00106-9.
4. Design, synthesis and application of fluorogenic probe for detecting L-asparaginase in serum samples / L. Wang [et al.] // *Results in Chemistry.* 2021. Vol. 3. Art. 100103. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100103>.
5. L-asparaginase II produced by salmonella typhimurium inhibits cell responses and mediates virulence / A. L. Kullas [et al.] // *Cell Host Microbe.* 2012. Vol. 12, N 6. P. 791–798.
6. Deciphering additional roles for the EF-Tu, L-asparaginase II and OmpT proteins of shiga toxin-producing *Escherichia coli* / A. N. Torres [et al.] // *Microorganisms.* 2020. Vol. 8, N 8. DOI: 10.3390/microorganisms8081184.
7. Cell-cycle inhibition by *Helicobacter pylori* l-asparaginase / C. Scotti [et al.] // *PLoS One.* 2010. Vol. 5, N 11. e13892.
8. Gilbert R., Tanenbaum N., Bhattacharya S. Asparagine biosynthesis as a mechanism of increased host lethality induced by *Serratia marcescens* in simulated microgravity environments // *Heliyon.* 2022. Vol. 8, N 5. e09379. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09379.
9. Extraction and purification of L-asparaginase 80 produced by *Acinetobacter baumannii* and their antibiofilm activity against some pathogenic bacteria / S. N. Muslim [et al.] // *The international journal of biotechnology.* 2016. Vol. 5, N 1. P. 7–14.
10. Коркина Ю. С., Валиев Т. Т. L-аспарагиназа: новое об известном препарате // *Педиатрическая фармакология.* 2021. Т. 18, N 3. С. 227–232.

11. Бактериальные рекомбинантные L-аспарагиназы / Н. Н. Соколов [и др.] // Биомед. Хим. 2015. Т. 61, №3. С. 312–324.
12. L-аспарагиназа холерных вибрионов / О. В. Дуванова, Е. С. Шипко, Б. Н. Мишанькин, А. Л. Галичева // Холера и патогенные для человека вибрионы : материалы пробл. комиссии. Ростов-на-Дону, 2017. Вып. 30. С. 78–80.
13. Asparagine assimilation is critical for intracellular replication and dissemination of *Francisella* / G. Gesbert [et al.] // Cell Microbiol. 2014. Vol. 16, N 3. P. 434–449.
14. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms / R. V. Mahajan [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. 2013. Vol. 341, N 2. P. 122–126.

УДК 658.5

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO*

**Ж. А. Коновалова, Н. М. Андреевская, И. А. Дихтярева,
О. Н. Ивашкова, С. В. Юденич, С. В. Балахонов**

*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, г. Иркутск, Россия
konovalova-shanna@mail.ru*

The quality of manufactured medical devices for *in vitro* diagnostics produced at the Irkutsk Research Anti-Plague Institute at the freezing stage, which is a key stage of lyophilization, is confirmed by validation measures. To demonstrate the stability of the temperature parameter, a descriptive method of statistical analysis was used, including filling out a control sheet and a control card. The results obtained indicate that this functional characteristic meets the criteria of acceptability declared by the manufacturer.

Важное значение в решении проблем качества медицинских изделий для диагностики *in vitro* (МИ ИВД) приобретает обеспечение точности и стабильности лиофильного высушивания, особенно тех параметров, которые имеют существенное функциональное влияние на эксплуатационные показатели выпускаемой продукции. Основным инструментом обеспечения качества производимых МИ ИВД является валидация, в том числе аттестация оборудования и статистический анализ стабильности валидируемых параметров. Контроль температуры необходим уже на стадии замораживания, которая является стадией первостепенной важности и определяет качество последующих этапов с точки зрения влияния на продолжительность концентрирования полупродукта вымораживанием и размеры кристаллов льда. Контроль температуры продукта является обязательным в процессе сублимационной сушки, поскольку качество конечного продукта может быть поставлено под угрозу, когда его температура превышает пороговое значение, которое является характеристикой каждого продукта, подвергаемого сублимационной сушке. С целью подтверждения того, что значения температуры замораживания полупродукта МИ ИВД находятся в предварительно установленных границах, и процесс лиофилизации является стабильным, необходимо проводить его тщательное рассмотрение, т. е. валидацию.

Цель исследования – провести испытания стабильности температурных режимов стадии замораживания МИ ИВД в сублимационной установке LP-10.

Сублимационные установки LP-10 (IShinBioBase Co. Ltd., Корея). Критическими параметрами процесса, включая допустимые отклонения на стадии замораживания выбрана температура, так как этот параметр оказывает наибольшее влияние на процесс сублимационного высушивания.

Текущий контроль температурного режима замораживания при производстве МИ ИВД осуществляли дескриптивным методом статистического анализа, в котором использовали малые выборки, вычисляли средние значения, дисперсию, которые вносили в контрольные листки с последующим построени-

ем контрольных карт, на которых обозначили средние арифметические, предупредительные $T_{\text{пн}}$ и $T_{\text{пв}}$ ($M \pm 2\sigma$) и контрольные $T_{\text{кн}}$ и $T_{\text{кв}}$ границы ($M \pm 3\sigma$), установленные специалистами научно-производственного отдела.

Сотрудниками лаборатории вакуумной сушки и упаковки научно-производственного отдела института проведено девять циклов сублимационного высушивания зарегистрированных в Росздравнадзоре МИ ИВД, производимых в Иркутском противочумном институте Роспотребнадзора в период с 2020 по 2022 г. (табл.). Критерий приемлемости допустимых значений температуры замораживания установлен эмпирическим путем за период наблюдения 30 лет и его значения составили от минус 45 до минус 51 °С. Первым этапом дескриптивного метода является заполнение контрольного листка, в который заносят первичные данные значений параметров замораживания на трех полках лиофилизатора, рассчитанное среднее значение температуры, нижние и верхние значения предупредительных и контрольных границ 95 % и 99 % доверительных интервалов.

Таблица

Контрольный листок данных температурного режима этапа замораживания при лиофилизации

Номер цикла	Температура продукта на полках, °С			Среднее значение температуры (M), °С	$M \pm 2\sigma$, °С		$M \pm 3\sigma$, °С	
	1	2	3					
1	-49	-50	-50	-49,67	-49,00	-50,33	-48,67	-50,67
2	-50	-50	-49	-49,67	-49,00	-50,33	-48,67	-50,67
3	-49	-49	-50	-49,33	-48,67	-50,00	-48,33	-50,33
4	-49	-50	-49	-49,33	-48,67	-50,00	-48,33	-50,33
5	-49	-48	-50	-49	-47,00	-51,00	-46,00	-52,00
6	-49	-50	-49	-49,33	-48,67	-50,00	-48,33	-50,33
7	-49	-48	-50	-49	-47,00	-51,00	-46,00	-52,00
8	-50	-50	-49	-49,67	-49,00	-50,33	-48,67	-50,67
9	-48	-47	-47	-47,33	-46,67	-48,00	-46,33	-48,33

Следующий этап – построение контрольной диаграммы (рис.) с нанесение значений средних, значений предупредительных границ ($\text{среднее} \pm 2\sigma$) и контрольных границ с учетом размаха ($\text{среднее} \pm 3\sigma$). Если среднее значение выходит за контрольные границы или два последовательных значения переходят предупредительные границы, полагают, что процесс производства изменился. Исследуется причина значительного отклонения, исключается «ошибка», и процесс юстируется вновь.

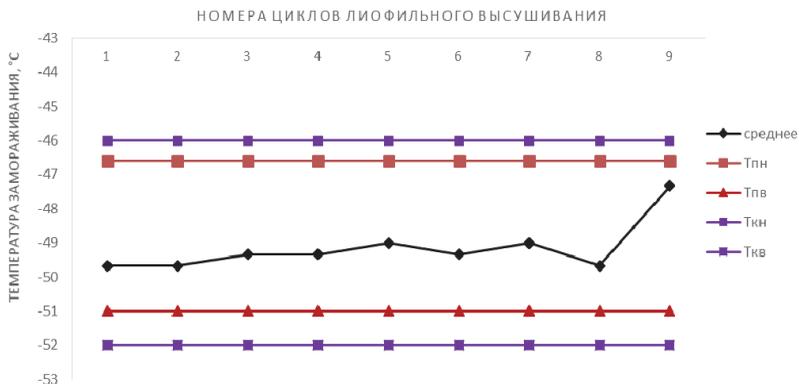


Рис.. Точностная диаграмма (контрольная карта) температурного режима этапа замораживания при лиофилизации МИ ИВД

Примечание. $T_{пн}$ – нижняя предупредительная граница 95 % ДИ; $T_{пв}$ – верхняя предупредительная граница 95 % ДИ; $T_{кн}$ – нижняя контрольная граница 99 % ДИ; $T_{кв}$ – верхняя контрольная граница 99 % ДИ

Диаграмма наглядно отображает ход самого критического этапа сублимационного высушивания – стадии замораживания. Установлено, что на протяжении всех девяти циклов сублимационного высушивания, этап замораживания протекает стабильно, средние не превышают значения верхних и нижних предупредительных и контрольных границ критериев приемлемости. Различия в значениях температуры заморозки МИ ИВД между девятым циклом и остальными восьмью достоверно не различаются.

Таким образом, применение статистического анализа результатов изменений значений температуры замораживания позволило предоставить объективные свидетельства стабильности процесса лиофилизации МИ ИВД на сублимационной установке LP-10 и получить систематизированную непрерывную информацию о критических температурных параметрах процесса лиофилизации, что необходимо для дальнейшего совершенствования технологического процесса и его статистического регулирования.

УДК 57.083.13+547.478

ГИДРОМЕТАЛЛАТРАНЫ: ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN SILICO* И *IN VITRO*

С. В. Лукьянова¹, Н. Г. Гефан¹, Н. А. Войченко¹, Е. Н. Оборина²,
М. Д. Катеринич², С. Н. Адамович²

¹Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Иркутск, Россия

²Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Россия
svetalukyan@mail.ru

The physicochemical and pharmacokinetic properties of a number of hydrometallatrans (HMAs), as well as their effect on the growth of pathogenic microorganisms, have been studied *in silico* and *in vitro*. Computational screening (SwissADME program) showed that GMAs are bioavailable compounds and have drug-like properties. It has been established that GMA, where M=Co and Zn, at low concentrations have a significant (up to 71 %) growth-stimulating effect on the test strains *Listeria monocytogenes* 766 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P (FDA 209-P).

Одним из направлений совершенствования технологии изготовления медицинских изделий для диагностики *in vitro*, а также средств специфической иммунопрофилактики остается оптимизация питательных сред, позволяющая повысить их эффективность и сократить время культивирования микроорганизмов. Биостимуляторы синтетического происхождения могут позволить удешевить и усовершенствовать процесс культивирования.

В Иркутском институте химии им. А. Е. Фаворского СО РАН синтезированы уникальные комплексы триэаноламина (ТЭА) – «Атраны», например, протатраны (ПА), силатраны (СА), а также гидрометаллатраны (ГМА), $\text{MX}_n \cdot [\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3]_m$, (для краткости $\text{MX}_n \cdot m\text{ТЭА}$), где М = металл; X = хлор, ацетат и др. Ранее было показано, что ПА, СА и ГМА проявляют антиоксидантное, иммуностропное, антисклеротическое, противораковое, ростстимулирующее и др. биологическое действие [3; 4]. ГМА как потенциальные доноры микроэлементов перспективны для дизайна биопрепаратов, но исследованы, в основном, с точки зрения синтеза и строения [1; 5], а их физико-химические свойства, а также действие на микроорганизмы изучены явно недостаточно.

Цель работы – изучение физико-химических (*in silico*) свойств ГМА и оценка их биологического действия в отношении особо опасных микроорганизмов (*in vitro*).

Материалы и методы. Физико-химические и фармакокинетические свойства ГМА оценивали с помощью программы SwissADME (<http://www.swissadme.ch>).

Влияние биологически активных соединений ГМА (состава 1:1 и 1:2): Ni(ac)₂•1ТЭА (1), Co(ac)₂•1ТЭА (2), CoCl₂•2ТЭА (3), ZnCl₂•2ТЭА (4), Zn(ac)₂•1ТЭА (5) (в концентрации от 0,05 до 400 мг/л) на рост грамположительных *Listeria monocytogenes* 766, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P (FDA

209-Р) и грамотрицательных микроорганизмов *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Y. enterocolitica* ОЗ 628/1 (коллекция патогенных бактерий Иркутского научно-исследовательского противочумного института) изучали микрометодом серийных разведений. Контроль – питательная среда без добавления 1–5. Численность бактерий определяли спектрофотометрически по оптической плотности (ОП) культуральной среды при λ 490 нм на спектрофотометре Mark (Bio-Rad, США).

Все эксперименты проводили в трех повторах. Результаты учитывали по унифицированному способу и выражали в виде индекса стимуляции (ИС) роста микроорганизмов, который вычисляли как соотношение величин ОП в опытной и контрольной пробах в процентах. Результаты обрабатывали статистически стандартными методами с применением пакета программ Microsoft Excel (2007). Полученные данные выражали в виде среднего арифметического (М) и стандартного отклонения (s). Различия принимали как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. Компьютерный скрининг (*in silico*) ADME (адсорбция, распределение, метаболизм, выделение) свойств показал, что ГМА 1–5 соответствуют правилу Липинского [2], обладают липофильностью, водорастворимостью, биодоступностью.

In vitro установлено, что образцы 1–5 в концентрации от 0,05 до 25,00 мг/л проявляют ростстимулирующую активность как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов (табл.).

Таблица

Стимулирующее действие гидрометаллатранов, ИС, %

№ образца	ГМА	Формула	<i>L. monocytogenes</i> 766	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	<i>Y. enterocolitica</i> 03 628/1	<i>Y. pestis</i> EV
1	Ni(ac) ₂ · 1ТЭА	C ₁₆ H ₃₆ N ₂ O ₁₀ Ni	15,5±4,9	12,5±1,6	12,5±3,3	8,9±2,6
2	Co(ac) ₂ · 1ТЭА	C ₁₀ H ₂₁ NO ₇ Co	39,4±11,0	30,9 ± 2,6	15,5±4,1	20,1±8,2
3	CoCl ₂ · 2ТЭА	C ₁₂ H ₃₀ N ₂ O ₆ Cl ₂ Co	34,4±12,8	35,1±6,6	12,7±3,3	10,9±1,6
4	ZnCl ₂ · 2ТЭА	C ₁₂ H ₃₀ N ₂ O ₆ Cl ₂ Zn	67,7±3,5	41,7±10,6	24,9 ± 2,4	25,9±1,9
5	Zn(ac) ₂ · 1ТЭА	C ₁₀ H ₂₁ NO ₇ Zn	46,1±9,4	29,0±6,5	12,7±4,1	18,9±2,6

Высокая статистически значимая стимулирующая активность у образцов 2, 3, 4 и 5 показана в отношении грамположительных микроорганизмов *S. Aureus* ATCC 6538-P (FDA 209-Р) (ИС до 41,7±10,6 %) и *L. monocytogenes* 766 (ИС до 67,7±3,5 %) по сравнению с грамотрицательными тест-штаммами (в среднем больше в 1,6–2,8 раза, $p < 0,05$) (табл.). Грамположительные виды бактерий более чувствительны к действию изученных ГМА, чем грамотрицательные. Наибольшее стимулирующее действие в отношении всех изученных микроорганизмов проявлял ГМА 4 (M=Zn)(ИС в среднем составил 25,4±2,2 % для грамотрицательных тест-штаммов и 54,7±7,1 % – для грамположительных).

Таким образом, анализ биологической активности ГМА показал, что ее проявление зависит от химического состава и концентрации действующего вещества, а также вида патогенного микроорганизма. ГМА4(ZnCl₂•2ТЭА) может служить в качестве перспективного ростстимулирующего агента для быстрого накопления биомассы грамположительных микроорганизмов и, как следствие, ускоренного анализа и диагностики болезней, вызванных этими микроорганизмами.

Работа по синтезу соединений и изучению их физико-химических свойств выполнена при финансовой поддержке РНФ и Правительства Иркутской области (проект № 23-26-10007).

Список литературы

1. Krabbes I., Seichter W., Gloe K. Bis(triethanolamine-O,O')-nickel(II) diacetate // ActaCrystallogr., Sect. 2000. Vol. 56, e178. <http://doi.org/10.31857/S0044460X21120015>
2. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // Adv. Drug Delivery Rev. 2001. Vol. 46. P. 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
3. Adamovich S. N., Oborina E. N. Metallatranes and hydrometallatranes: their immunotropic and antitumor properties // Russian Chemical Bulletin. 2019. Vol. 68. P. 1723–1728. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2616-y>
4. Adamovich S. N. New atranes and similar ionic complexes. Synthesis, structure, properties // Applied Organomet. Chem. 2019. Vol. 33, N 7. e4940. <https://doi.org/10.1002/aoc.4940>
5. Synthesis, characterization and spectral studies of triethanolamine complexes of metal saccharinates. Crystal structures of [Co(TEA)(2)](SAC)(2) and [Cu-2(μ-TEA)2(SAC)2]•2(CH₃OH) / Y. Topcu, O. Andac, V. T. Yilmaz, W. T. A. Harrison // Journal of Coordination Chemistry. 2002. Vol. 55. P. 805–815. <http://doi.org/10.1080/0095897022000001557>

УДК 577.21

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПРЯМОГО ПЦР-АНАЛИЗА ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН ЛУКА РЕПЧАТОГО *ALLIUM CEPA* L.

М. Мардини, А. С. Ермолаев, Л. И. Хрусталева

*Российский государственный аграрный университет –
Московская сельскохозяйственная академия им. К. А. Тимирязева, г. Москва, Россия
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии, г. Москва, Россия
m. mardini@rgau-msha.ru*

In this work, a direct PCR protocol on onion pollen suspension was adapted with no prior DNA extraction. We showed that a limiting factor for successful PCR on pollen suspension is the sticky outer layer on the surface of pollen grains also known as pollenkitt, which can inhibit amplification. Simple pre-washing step of pollen suspension was able to eliminate the pollenkitt and enormously affect PCR results. PCR was also performed on a single pollen grain followed by fluorescent microscopy. This observation suggests that DNA is not released from pollen grain during PCR but rather the components of PCR mix must be penetrated inside and started the amplification process. Our findings hold significant potential for diverse applications in plant breeding, genome editing, and fundamental pollen-based molecular studies.

Пыльцевое зерно представляет собой очень интересный объект исследования. Изучение пыльцевых зерен давно привлекает внимание в различных областях, таких как палеонтология, криминалистика, разработка вакцин, аллергология и многие другие. В области селекции растений, генетическое и молекулярное исследование пыльцевых зерен играет важную роль в определении наследственных характеристик и разработке новых сортов. Важным аспектом является тот факт, что пыльцевое зерно обычно состоит из 2–3 гаплоидных клеток, что предоставляет уникальные возможности для проведения фундаментальных исследований в области генотипирования ДНК и популяционной генетики [1; 2].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является наиболее распространенным инструментом в молекулярной биологии для анализа ДНК. Поскольку генетический материал внутри пыльцевых зерен сильно защищен жесткой пыльцовой оболочкой, этап выделения ДНК считается критическим для успешной реакции ПЦР. Для этой цели обычно используются методы механического измельчения, ферментативного лизиса или их комбинации [1; 2]. Однако некоторые наблюдения предполагают, что ДНК может пассивно высвободиться из пыльцевых зерен из-за высокой температуры во время проведения ПЦР-амплификации [3], либо, у некоторых определенных видов, пыльцевые зерна просто лопнуть при контакте с жидкостью [4]. Другой проблемой ПЦР на пыльце является возможное ингибирование ПЦР из-за некоторых веществ эндогенно присутствующих в пыльцевых зернах, однако в нескольких исследованиях утверждается, что компоненты пыльцевых зерен не оказывают влияния на прохождение ПЦР [2].

Исходя из различных наблюдений в литературы, становится ясно, что ПЦР на пыльце может быть видоспецифичной процедурой. Более того, заметный недостаток исследований по коммерчески значимым культурам подчеркивает важность адаптации протоколов для новых видов. В данной работе мы представляем простой протокол прямой ПЦР на пыльцевых зернах лука (*Allium cepa* L.) без выделения ДНК. Наше исследование позволило выявить, что основным ограничивающим фактором, влияющим на успешность ПЦР на пыльцевых зернах, является наличие липкого внешнего слоя, известного как полленкит (Pollenkitt), который может ингибировать реакцию ПЦР. Полленкит обычно окружает поверхность большинства насекомоопыляемых пыльцевых зерен. Полленкит представляет собой гидрофобную смесь, состоящую в основном из насыщенных и ненасыщенных липидов, а также каротиноидов, флавоноидов, белков и углеводов [5]. В нашем исследовании мы обнаружили, что простая промывка суспензии пыльцевых зерен позволило удалить полленкит и значительно повлияло на результаты ПЦР. Для подтверждения взаимосвязи между ингибированием ПЦР и полленкитом мы провели серию ПЦР с различными разведениями полленкита. Электрофорез показал четкую отрицательную корреляцию между концентрацией полленкита и интенсивностью бэндов ПЦР-продукта.

Кроме того, в ходе нашего исследования также было выяснено, что физическая структура пыльцевого зерна сохраняется после ПЦР. Это было обнаружено в результате проведения ПЦР на единичных пыльцевых зернах. Окрашивание DAPI и флуоресцентная микроскопия показали, что жесткая структура пыльцевого зерна выдержала циклы ПЦР. Генеративное и вегетативное ядра были четко различимы, как и на пыльце до ПЦР. Это наблюдение предполагает, что геномная ДНК не высвобождается из пыльцевого зерна во время ПЦР, а, скорее всего, компоненты смеси ПЦР проникают внутрь зерна и иницируют процесс амплификации.

Исследование было выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-016-00065 и НЦМУ «Агротехнологии будущего» №075-152022-317.

Список литературы

1. Matsuki Y., Isagi Y., Suyama Y. The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain // *Molecular Ecology Notes*. 2007. Vol. 7, N 2. P. 194–198.
2. Chen P. H., Pan, Chen R. K. High-throughput procedure for single pollen grain collection and polymerase chain reaction in plants // *Journal of Integrative Plant Biology*. 2008. Vol. 50, N 3. P. 375–383.
3. Levin I., Gilboa N. Direct PCR using tomato pollen grain suspensions // *BioTechniques*. 1997. Vol. 23, N 6. P. 986–990.
4. Petersen G., Johansen B., Seberg O. PCR and sequencing from a single pollen grain // *Plant Molecular Biology*. 1996. Vol. 31. P. 189–191.
5. Chichiricò G., Pacini E., Lanza B. Pollenkitt of some monocotyledons: lipid composition and implications for pollen germination // *Plant Biology*. 2019. T. 21. №. 5. С. 920–926.

УДК 57.088

СИНТЕЗ ЦЕЛЛЮЛАЗ *TRICHODERMA VIRIDE* ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ПРИСУТСТВИИ РАЗНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ СУБСТРАТОВ

А. В. Новиков, А. А. Приставка, В. П. Саловарова

Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия
artem.ru88@mail.ru

This research examined the effect of the type of cellulose substrate on the induction of the synthesis of the *Trichoderma viride* cellulase complex. The highest specific activity was recorded on Czapek's medium with 1 % microcrystalline cellulose.

Переработка лигноцеллюлозных субстратов остается одной из приоритетных задач экономики и экологии Прибайкалья. Традиционные способы утилизации отходов ЛПК, АПК, целлюлозобужной и деревоперерабатывающей промышленно не способны справиться с возрастающими объемами отходов, поэтому разработка биотехнологических процессов их трансформации является актуальной. Наиболее известным и перспективным продуцентом является грибы рода *Trichoderma*, которые не только обладают мощным целлюлазным аппаратом, но также способны образовывать различные метаболиты, которые могут быть использованы в медицине, фармацевтике, сельском хозяйстве и др. отраслях промышленности [1; 2]. Для повышения эффективности выхода целевых продуктов микробного синтеза используются разные методы, прежде всего – оптимизация условий культивирования. Совершенствование питательных сред, включение различных питательных добавок и стимуляторов роста позволяет повысить эффективность культивирования и обеспечить максимальное накопление биомассы продуцента.

Цель работы: исследовать влияние разных целлюлозных субстратов на способность *Trichoderma viride* синтезировать ферменты целлюлазного комплекса при глубинном культивировании.

Объекты и методы. В качестве продуцента использовался штамм *Trichoderma viride* 7–26 из коллекции кафедры физико-химической биологии, биоинженерии и биоинформатики. Культивирование проводилось в колбах на качалке (16 об/мин) при 20 °С на жидкой среде Чапека, в которую вносили два разных целлюлозных субстрата – микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) в концентрациях 0,5, 1 и 1,5 % и фильтровальную бумагу (ФБ) в концентрации 1 %. В качестве контроля использовалась питательная среда с 1 % сахарозой. Через 8 сут культивирования в культуральных жидкостях измеряли общую целлюлазную активность методом Шомоди – Нельсона и внеклеточную концентрацию белка методом спектрофотометрии в УФ-области.

Результаты и обсуждение. Самая низкая целлюлазная активность и по абсолютным, и по удельным значениям ожидаемо зарегистрирована для контрольной питательной среды, не содержащей индукторов синтеза целлюлаз, хотя на среде с сахарозой внеклеточный белок накапливался наиболее интенсивно (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1

Показатели ферментной, белковой и удельной активности *Trichoderma viride*

Источник углерода / количество, %	Общая целлюлозная активность, МЕ/мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, МЕ/г белка
МКЦ / 0,5	0,059	0,187	316
МКЦ / 1,0	0,053	0,209	254
МКЦ / 1,5	0,060	0,250	240
ФБ / 1,0	0,008	0,266	30
Сахароза / 1,0	0,0027	0,403	7

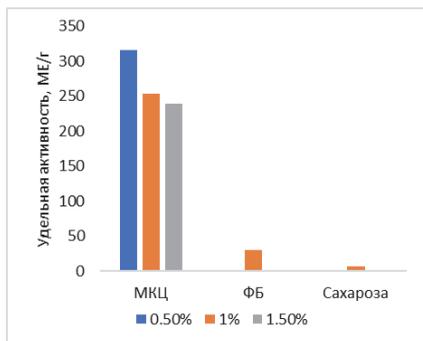


Рис. 1. Удельная целлюлозная активность в культуральных жидкостях *Trichoderma viride* на основе разных субстратов

На среде с фильтровальной бумагой активность увеличивалась в 3–4 раза, но наиболее мощным индуктором оказалась микрокристаллическая целлюлоза – относительно контрольной среды активность на средах с МКЦ увеличилась ~ в 20 раз. Примечательно, что концентрация индуктора в этом случае не влияет на абсолютные показатели активности, но она обратно пропорциональна удельной активности фермента. Т. е. высокие концентрации микрокристаллической целлюлозы стимулируют накопление в питательной среде не только целлюлаз, но какие-то других внеклеточных белков.

Таким образом, наличие подходящего целлюлозосодержащего субстрата в питательной среде является обязательным условием достижения высоких значений целлюлозной активности *T. viride*. Сопряженный синтез не целлюлозных белков так же представляет практический интерес, так как может быть связан с образованием ценных вторичных метаболитов.

Список литературы

1. *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent / M. Sood [et al.] // *Plants*. 2020. Vol. 18, N 9(6). P. 762. DOI: 10.3390/plants9060762
2. *Fungal Cellulases* / C. M. Payne [et al.] // *Chemical Reviews*. 2015. Vol. 115 (3). P. 1308–1448. DOI: 10.1021/cr500351c

УДК 581.1

ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ КАК ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СТОХАСТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Ю. В. Нурминская, Л. А. Максимова, Т. В. Копытина, А. Г. Еникеев

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
julosti@yandex.ru*

The fluctuating asymmetry of the leaf blade (leaf area on the left and right) in transgenic tobacco plants was studied. The stability of the functioning of the transgenic plants genome was reduced and this instability was also found in generations (up to T₆ in tobacco). According to our data transformation leads to a change in stochastic variability in tobacco and pea plants.

Стохастическая (флуктуационная) изменчивость – это особый вид изменчивости, имеющей надгеномное (эпигенетическое и иное) происхождение [6; 11]. Она возникает в результате эпигенетических и стохастических различий в работе генома клеток многоклеточного организма и дополняет наследственную и модификационную изменчивости [7]. Способность организма генерировать стохастическую изменчивость – его неотъемлемое свойство [11]. Эта изменчивость играет важную роль в эволюционном процессе, так как увеличивает вариабельность признаков без изменений в геноме [10]. Несмотря на то, что, казалось бы, стохастическая изменчивость не имеет отношения к последовательности ДНК, показано, что величина этой изменчивости, характерная для данного организма, наследуется [8]. Это не вызывает удивления, если учесть, что, согласно исследованиям последних 30 лет, организмы способны передавать эпигенетические настройки генома следующим поколениям [10].

Несмотря на то, что в мире, и особенно в СССР, а позже в России, изучению этого вида изменчивости всегда уделялось внимание, всё ещё остаётся много вопросов, связанных с пониманием механизма реализации стохастической изменчивости, а также её значением эволюционным и экологическим.

Стохастическую изменчивость изучали на разных объектах, начиная с бактерий и заканчивая млекопитающими [11]. Однако до сих пор она не изучалась на трансгенных организмах. Трансгенный организм интересен как объект для изучения флуктуационной изменчивости потому, что мы до сих пор мало знаем о последствиях, которые происходят на эпигенетическом уровне у организмов, подвергшихся генетической трансформации. Тем не менее, изменения в эпигенетической регуляции генома вполне могут быть, и прежде всего мы можем узнать об этом через изучение стохастической изменчивости.

Непрерывным условием для проведения подобного исследования мы видим изучение стохастической наследственности в поколениях. Это позволит отследить, в какой степени наследуется величина стохастической изменчивости у исследуемых организмов.

Одним из наиболее легко регистрируемых проявлений стохастической изменчивости является флуктуирующая асимметрия (ФА) билатеральных при-

знаков. Различия между правой и левой стороной – результат стохастических вариаций в работе генома.

Достоинства изучения именно билатеральной асимметрии заключаются в следующем. Прежде всего, мы получаем возможность принимать левую и правую часть органа (например, листа) как два генетических клона, развивавшихся в максимально близких условиях среды, поэтому специально клоны создавать не нужно. Далее, мы можем принять в качестве дополнительного контроля нулевую асимметрию. При отсутствии контрольных организмов можно заменить контроль данными из шкалы величин ФА, разработанной Захаровым [1]. При этом измерения, как правило, несложны и доступны, их можно проводить с помощью компьютерных программ.

В нашей работе мы изучали асимметрию листовой пластинки (площадь листа слева и справа) у трансгенных растений табака. Табак сорта Самсун был трансформирован агробактерией (штамм A699) с генетической конструкцией, содержащей маркерные гены *nptII* и *gus*. Было получено шесть поколений табака [4]. Растения выращивались как в оптимальных условиях, так и при пониженной или повышенной температуре [3; 5]. Также изучалась реакция растений на повышенное освещение. Каждый эксперимент имел три повторности, $n = 30$.

При оптимальных условиях выращивания ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, освещённость $200\text{ мкмоль/м}^2\text{с}$) нам не удалось выявить статистически значимые отклонения в величине флуктуирующей асимметрии (рис. 1).

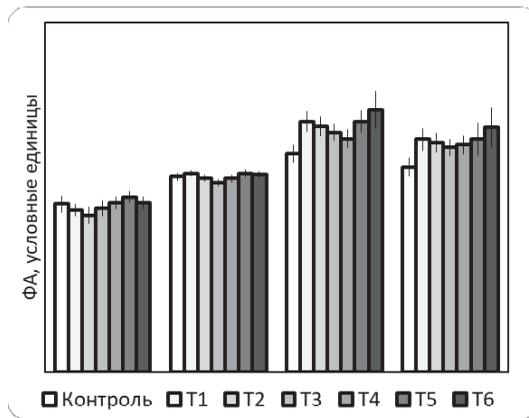


Рис. 1. Величина флуктуирующей асимметрии у контрольных и трансгенных растений табака в разных условиях среды. Приведены значения средней и стандартного отклонения

Такой же результат мы получили, изучив флуктуирующую асимметрию листа у растений, росших при повышенной температуре ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$). Однако более значимые для табака факторы, такие как сниженная температура ($15\text{ }^{\circ}\text{C}$) или слишком сильное освещение ($760\text{ мкмоль/м}^2\text{с}$), повлияли на стабильность

работы генома таким образом, что величина флуктуирующей асимметрии у трансгенных и контрольных растений отличалась. Статистически значимые отличия величины ФА от контрольных значений мы зарегистрировали у всех поколений от T_1 до T_6 , что свидетельствовало о большей чувствительности таких растений к стрессовым факторам среды. Иными словами, геном изученных трансгенных растений работает сравнительно стабильно, пока условия среды не слишком отклоняются от оптимума (можно принять, что температура 35 °С близка к оптимальному диапазону 20–30 °С), однако выход какого-либо параметра среды далеко за рамки оптимальных значений сильнее дестабилизирует геном трансформанта по сравнению с контролем.

В одной из предыдущих работ нами было обнаружено увеличение величины ФА у первых двух поколений трансгенных растений гороха сорта «Казанец», выращиваемого в нормальных условиях [2]. Генетическая конструкция, введенная нами в геном этих растений посредством агробактериальной трансформации, также не содержала целевых генов (использовали дикий штамм A281). Таким образом, геном трансгенного гороха даже в оптимальных условиях работал недостаточно стабильно (согласно шкале Захарова). К сожалению, не удалось изучить величину ФА у полученных трансгенных растений в стрессовых условиях среды.

Изучение стохастической (флуктуационной) изменчивости у трансформированных организмов позволяет получать данные, полезные для двух сфер научного интереса: закономерности проявления и наследования стохастической изменчивости и стабильности функционирования генома трансгенных организмов. Так, наши пилотные исследования показали, что:

- стабильность функционирования генома трансгенных растений снижена;
- эта нестабильность проявляется и в поколениях (до T_6 у табака, дальнейшие поколения не изучены);
- трансформация приводит к изменению (увеличению) стохастической (флуктуационной) изменчивости у растений табака и гороха.

Таким образом, полученные данные показывают, что трансгенное растение – объект, который может стать источником новых важных подробностей о стохастической изменчивости организмов. Даже простой анализ флуктуирующей асимметрии позволяет зарегистрировать последствия трансформации на стабильность генома.

Список литературы

1. Здоровье среды: методика оценки / В. М. Захаров [и др.]. М. : Центр экол. политики России, 2000. Т. 65. С. 68.
2. Анализ асимметрии морфоструктур листа и оценка стабильности развития трансформированных растений гороха / Ю. В. Нурминская [и др.] // Проблемы экологии: чтения памяти проф. М. М. Кожова : тез. докл. Междунар. науч. конф. и междунар. шк. для мол. ученых. Иркутск, 20–25 сент. 2010 г. Иркутск : Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. С. 440.
3. Процедура трансформации вызывает изменения стабильности развития и интенсивности фотосинтеза в ряду поколений у растений табака / Ю. В. Нурминская [и др.] // Из-

вестия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2013. Т. 6, №. 3. С. 3–8

4. Анализ уровня стабильности развития трансгенных растений табака в пяти поколениях / Ю. В. Нурминская [и др.] // Физиология растений и генетика. 2014.

5. Влияние генетической трансформации на устойчивость растений табака к пониженной температуре / Ю. В. Нурминская [и др.] // Вопросы естествознания. 2014. №. 1. С. 14–20.

6. Тиходеев О. Н. Классификация изменчивости по факторам, определяющим фенотип: традиционные взгляды и их современная ревизия // Экологическая генетика. 2013. Т.11.№. 3. С. 79–92.

7. Тиходеев О. Н. Изменчивость и ее формы: дифференциальный подход // Труды зоологического института РАН. 2018. Т. 322, №. 2. С. 185–201.

8. Epigenetic inheritance and reproductive mode in plants and animals / D. Anastasiadi [et al.] // Trends in Ecology & Evolution. 2021. Vol. 36, N 12. P. 1124–1140.

9. Burggren W. Epigenetic inheritance and its role in evolutionary biology: re-evaluation and new perspectives // Biology. 2016. Vol. 5, N 2. P. 24.

10. Skinner M. K., Nilsson E. E. Role of environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance in evolutionary biology: Unified Evolution Theory // Environmental Epigenetics. 2021. Vol. 7, N 1. P. dvab012.

11. Vogt G. Stochastic developmental variation, an epigenetic source of phenotypic diversity with far-reaching biological consequences // Journal of Biosciences. 2015. Vol. 40. P. 159–204.

УДК 602.6

КОНТРАСТНЫЕ ФЕНОТИПЫ ТРАНСГЕННОГО ТОПОЛЯ: ОТ КАРЛИКА ДО ГИГАНТА

В. В. Павличенко^{1,2}, М. В. Протопопова^{1,2}

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
vpavlichenko@gmail.com

The study was aimed to the agrobacterium mediated genetic transformation of poplar by genes encoding key enzymes of gibberellins biosynthesis. As a result, three contrast forms of transgenic poplars were obtained – fast-growing, moderate growth and dwarf.

Гиббереллины являются одной из важнейших групп фитогормонов, регулирующих рост и развитие растений. Кроме регуляции роста гормоны данной группы контролируют такие процессы как прорастание семян, удлинение корней и стеблей, рост листьев, закладку и развитие цветков, формирование плодов, участвуют в детерминации пола у растений. У высших растений ключевые пути биосинтеза гиббереллинов катализируются тремя ферментами: гиббереллин-20-оксидаза, гиббереллин-3-оксидаза и гиббереллин-2-оксидаза. Работы по изменению путей биосинтеза гиббереллинов генно-инженерным способом имеют важное прикладное значение. Так, растения с увеличенной скоростью роста обладают высоким ресурсным потенциалом, и могут быть использованы как источник быстро возобновляемого сырья для биорефайнинга, включая производство биотоплива. Кроме того, быстрорастущие древесные культуры могут быть использованы в мероприятиях по лесовосстановлению, ветрозащите или рекультивации загрязненных земель. Не менее важным представляется использование быстрорастущих трансгенных культур как биореакторов для наработки ценных метаболитов. В ряде публикаций показано, что отдельные гены, кодирующие ключевые ферменты биосинтеза гиббереллинов, могут быть эффективно использованы для генетической трансформации растений и получения фенотипа, характеризующегося ускоренным ростом и развитием. В настоящем исследовании мы демонстрируем эффекты генетических трансформаций тополя генами, кодирующими ключевые ферменты биосинтеза гиббереллинов гиббереллин-20-оксидазу (*AtGA20ox*), гиббереллин-3-оксидазу (*AtGA3ox*) и гиббереллин-2-оксидазу (*AtGA2ox*) из *Arabidopsis thaliana*. В качестве объекта генетической трансформации был выбран тополь берлинский (*Populus berolinensis* K. Koch) – гибрид тополя лавроволистного (*P. laurifolia* Ledeb.) и тополя черного (*P. nigra* L.). Тополь берлинский является удобным объектом для изучения эффектов генетической трансформации древесных растений. Данный вид быстро растет в лабораторной культуре, легко размножается срезанием и укоренением верхушечной части растения, а также дает много боковых побегов после срезания апикальной меристемы. Тополя и некоторые другие представители семейства ивовых относятся к наиболее быстрорастущим видам древесных рас-

тений в сложных климатических условиях нашей страны. Тополь в условиях Западной и Восточной Сибири достигает минимально необходимых размеров для использования уже через 4–5 лет после высадки в грунт. Древесина тополей обладает ценными свойствами, определяющими возможность ее широкого использования в различных областях промышленности. Так, она характеризуется высоким содержанием целлюлозы относительно лигнина, что делает ее ценным сырьем при производстве целлюлозы, полуцеллюлозы, древесной массы, этилового спирта, каучука. Пластичность древесины тополя определяет ее широкое использование в производстве строительных материалов и изготовлении мебели. Высокие экологические показатели сжигания древесины тополя делает ее перспективным сырьем при производстве различных видов биотоплива. Карликовые формы тополя могут найти свое применение в ландшафтном дизайне, а плотная узорчатая древесина таких форм может быть использована для производства мебели и других деревянных декоративных изделий. Агробактериальную генетическую трансформацию осуществляли с использованием бинарных векторных систем на основе плазмиды pBI121, несущих кодирующие последовательности генов *AtGA20ox*, *AtGA3ox* и *AtGA2ox* и содержащих селективный ген неомизин фосфотрансферазы II – *nptII*, определяющий устойчивость к антибиотику канамицину. В качестве растительных эксплантов для кокультивации с агробактерией использовали сегменты междоузлий без пазушных почек. Для регенерации и микроклонального размножения тополя использовали твердую питательную среду на основе MS 5524 с добавлением тиамина (1 мг/л), пиридоксина (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), сахарозы (20 г/л) и агары (7 г/л). Кислотность среды доводили до pH 5,7. Для регенерации трансгенных растений использовали только один тип питательной среды с добавлением бензиладенина (0,2 мг/л), тидиазурона (0,02 мг/л), нафтилуксусной кислоты (0,01 мг/л). В результате регенерации на селективной питательной среде, содержащей канамицин (50 мг/л) и цефотаксим (250 мг/л), были получены растения тополя берлинского трансгенные по генам *AtGA20ox*, *AtGA3ox* и *AtGA2ox*. Отсутствие агробактериальной контаминации у растений проверяли инкубацией частей листьев на питательной среде YEB без антибиотика. Трансгенез был подтвержден укоренением регенерантов в присутствии канамицина в питательной среде (50 мг/л) и положительным результатом ПЦР с использованием праймеров, специфичных к генам *nptII*, *AtGA20ox*, *AtGA3ox* и *AtGA2ox*.

Полученные трансгенные растения тополя берлинского обладали ярко выраженными фенотипическими отличиями от контрольных растений. Так, растения, экспрессирующие *AtGA20ox* обладали удлинненными междоузлиями, длинными узкими листьями и демонстрировали скорость роста в три раза превышающую контрольные значения. Тополь трансгенный по *AtGA3ox* также обладал увеличенными междоузлиями и более узкими листьями в сравнении с контролем, но скорость роста была увеличена в 1,5–2 раза. Генетическая трансформация тополя берлинского геном *AtGA2ox* привела к формирования карликового фенотипа. Такие растения практически не имели стебля и в высоту

не превышали 1 см в возрасте 3 месяца, в то же время контрольные растения достигали в высоту уже до 10–15 см в культуре *in vitro*.

В результате проделанной работы были получены три контрастных по фенотипу формы трансгенного тополя берлинского: 1 – растения со значительно увеличенной скоростью роста (3-кратное превышение скорости роста контрольных растений); 2 – растения с увеличенной скоростью роста (промежуточная форма между контролем и 1-м фенотипом); 3 – карликовая.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-01113, <https://rscf.ru/project/22-24-01113/>). Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к аналитическому оборудованию.

УДК 577.3

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПИРИДИЛ-, ФЕНИЛСОДЕРЖАЩИХ ФОСФИНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ С ТЕСТ-КУЛЬТУРАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

А. С. Пеньдюхова¹, В. Л. Михайленко¹, А. А. Приставка¹,
С. И. Верхотурова², Н. А. Белогорова², Г. В. Юринова¹

¹Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

²Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, г. Иркутск, Россия
annapend@yandex.ru

The ³¹P NMR spectroscopy method showed the multidirectional effect of pyridyl-, phenyl-containing phosphines and their derivatives on the growth of *Bifidobacterium bifidum* and *Escherichia coli*. The ability of microorganisms to transform the investigated compounds into both an inorganic phosphate-anion and intermediates suppressing their growth has been revealed.

Фосфорсодержащие соединения широко распространены в окружающей среде. Среди них выделяется класс фосфорорганических соединений (ФОС), обладающих уникальными физико-химическими свойствами, которые определяют практический интерес к этому классу соединений в разных областях науки и промышленности. Такие ФОС содержат прямую химическую связь углерод-фосфор, а также связи через гетероатом (сера, кислород или азот) [1]. Связи С-Р высоко устойчивы к физико-химическим и биологическим воздействиям, поэтому такие химические соединения, по своей природе являются ядами, так как у микро- и макроорганизмов в большинстве случаев отсутствуют ферменты, способные разрушать подобные вещества. Наибольший интерес представляют фосфины и их производные (оксиды, сульфиды), поскольку они легко синтезируются, и на данный момент разработаны современные и простые методы их получения. Наличие в фосфинах устойчивой связи С-Р, с одной стороны, позволяет синтезировать стабильные продукты химического синтеза (стабилизаторы и т. п.) и создавать устойчивые к клеточным ферментам фосфорорганические фармакологические субстанции. Однако, с другой стороны, высокая стабильность этих соединений может привести к их накоплению в окружающей среде с неблагоприятными экологическими последствиями. К тому же, механизмы биodeградации ФОС изучены очень слабо, известно лишь ограниченное количество работ, посвященных этому вопросу [2].

Цель работы: методом спектроскопии ЯМР ³¹P оценить влияние пиридил-, фенилсодержащих фосфинов и их производных на тест-культуры микроорганизмов и выявить возможные пути биотрансформации ФОС.

Одним из объектов исследования являлись ряд органилсодержащих фосфинов и их производных (оксиды, сульфиды), синтезированных по оригинальным методикам в лаборатории неперехватных гетероатомных соединений Иркутского Института Химии им. Фаворского А. Е. (ИрИХ СО РАН) (табл. 1).

Тест-культуры микроорганизмов:

- *Bifidobacterium bifidum*, полученные из ФГБНУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России: ВКМП АС – 1784 (кишечник здорового человека).
- *Escherichia coli* ATCC 35218 (штамм предоставлен В. А. Чхенкели, НИИ биологии ИГУ).

Таблица 1

ЯМР сигналы ³¹P исследуемых ФОС

№ ФОС п/п	Шифр	Сигнал ЯМР ³¹ P, м. д.
1	Трис(4-МеPh)P	-7,1 (CDCl ₃)
2	Трис(4-МеPh)PO	27,49 (CDCl ₃)
3	Трис(4-МеPh)PS	42,3 (CDCl ₃)
4	Трис[2-(4-Рy)Et]P	57,94 (H ₂ O)
5	Трис[2-(4-Рy)Et]PO	57,99 (H ₂ O)
6	Трис[2-(4-Рy)Et]PS	53,26 (H ₂ O)
7	PO ₄ ³⁻	~1 (H ₂ O)

Примечание: в скобках указан растворитель.

Культивирование проводили при 37 °С в тиогликолевой питательной среде, в которую вносили исследуемые препараты фосфорорганических соединений в виде спиртовых растворов (0,02 ммоль ФОС и 1 % этанола). Прирост биомассы микроорганизмов регистрировали спектрофотометрически по OD600. Все измерения проводились не менее, чем в двух повторностях. Экстракцию ФОС из культуральных жидкостей осуществляли хлороформом. спектроскопию ЯМР ³¹P проводили на базе Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН на приборах Bruker DPX 400 и Bruker AV-400.

Результаты исследований представлены в табл. 2.

Анализ результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. В контрольных средах (в табл. 1 не показаны) ЯМР-спектроскопия не выявила абиотическую трансформацию ФОС и не зарегистрировала изменение уровня внеклеточных фосфорсодержащих соединений при культивировании бактерий без ФОС.

2. Все фосфиноксиды угнетают рост бактерий, при этом эффект сильнее выражен для *B. bifidum*, а *E. coli* оказалась более толерантной. Возможно, это связано с разным отношением этих видов к кислороду.

3. Фосфинсульфиды, наоборот, проявляют стимулирующее действие либо не специфически (ФОС №3), либо только по отношению к *B. bifidum* (ФОС №6).

4. Микроорганизмы способны окислять фосфины до фосфинсульфидов и фосфиноксидов. Так, в присутствии *E. coli* ФОС № 1 частично преобразуется в ФОС № 2 и 3 (в соотношении 0,5:1:0,01 соответственно), а *B. bifidum* окисляет фосфин №4 до фосфинсульфида №6 (соотношение 1:1).

5. В некоторых случаях среди продуктов культивирования зарегистрирован сигнал, соответствующий фосфат-аниону, который может быть продуктом метаболического окисления ФОС.

Таблица 2

Сводные результаты культивирования тест-культур в присутствии ФОС и спектроскопии ЯМР культуральных жидкостей

Исходный ФОС	<i>B. bifidum</i>			<i>E. coli</i>		
	Детектируемый ФОС		Изменение биомассы, %	Детектируемый ФОС		Изменение биомассы, %
	КЖ (H ₂ O)	КЖ (CHCl ₃)		КЖ (H ₂ O)	КЖ (CHCl ₃)	
1	7	³¹ P нет	-30,2*	7	1, 2, 3	+6,8
2	7	³¹ P нет	-100*	³¹ P нет	2	-30,6*
3	7	³¹ P нет	+36,5*	7	3	+33,46*
4	4, 6, 7	н	+7,6	н	н	н
5	5, 7	н	-18,1*	н	н	н
6	7, -0,24	н	+20,9*	н	6	-31,6*

Примечание: КЖ – культуральная жидкость; * – отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$; н – эксперимент не проводили.

Таким образом, наблюдается взаимное влияние исследованных фосфорорганических соединений и культур микроорганизмов: с одной стороны, ФОС проявляют разнонаправленное действие на рост и развитие тест-культур, а с другой – микроорганизмы способны осуществлять трансформацию этих соединений как до неорганического фосфата, так и до интермедиатов, подавляющих развитие самих микроорганизмов. Оба эффекта необходимо учитывать при разработке и практическом использовании фосфинов и их производных.

Список литературы

1. Hilderbran R. L., Henderson T. O. The Role of Phosphonates in Living Systems // CRC Press: Boca Raton. 2017. P. 123–124.
2. Биодegradация фосфорорганических загрязнителей почвенными бактериями: биохимические аспекты и нерешенные проблемы / А. В. Свиридов [и др.] // Биотехнология. 2020. Т. 36, № 4. С. 126–135. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-126-135

УДК 581.1

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОСодЕРЖАЩИХ НАНОБИОКОМПОЗИТОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ РОСТОСТИМУЛЯЦИИ И ОЗДОРОВЛЕНИЯ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ

А. И. Перфильева

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск, Россия
alla.light@mail.ru*

The paper presents the results of a comprehensive study of the biological activity of five types of nanocomposites based on copper-containing and manganese-containing nanoparticles in combination with a natural polysaccharide (arabinogalactan, starch, carrageenan) against phytopathogenic bacteria, plants *in vitro* and seeds in order to develop new environmentally friendly and effective pesticides based on nanotechnology.

В работе представлены результаты комплексного исследования биологической активности пяти видов нанокomпозитов на основе медьсодержащих и марганецсодержащих наночастиц в комплексе с природным полисахаридом (арабиногалактан, крахмал, каррагинан).

Нанотехнологии активно внедряются в различные сферы народного хозяйства. Использование минеральных веществ в виде наносоединений привлекательно их малым расходом и высокой эффективностью по сравнению с солями металлов, используемых для растений в качестве источников минерального питания. Благодаря наличию высокой антибактериальной активности нановещества также перспективны в качестве альтернативы пестицидам. Нанопрайминг – это инновационная технология праймирования семян, которая помогает улучшить всхожесть семян, рост семян и урожайность за счет обеспечения устойчивости растений к различным стрессам.

Цель работы – исследовать влияние химически синтезированных нанобиокомпозитов на основе наночастиц металлов и природных полисахаридов на жизнеспособность фитопатогенных бактерий, растений картофеля *in vitro* и прорастание семян сои с целью разработки новых ростостимуляторов и средств для оздоровления растений.

Настоящее исследование включает в себя изучение антибактериального эффекта нанокomпозитов по отношению к фитопатогенным бактериям *Clavibacter sepedonicus* и *Pectobacterium carotovorum*, вызывающим гнилостные процессы в различных органах и тканях культурных растений. Эффект нанокomпозитов в отношении растений был изучен на следующих модельных системах – зеленые растения картофеля *in vitro* и проростки семян сои. Картофель и соя играют важную роль в обеспечении глобальной продовольственной безопасности, поэтому чрезвычайно актуален поиск экологически безопасных и эффективных средств для их ростостимуляции и оздоровления от заболеваний.

Экспериментальная часть. В качестве нанобиокомпозитов в работе использовали химически синтезированные нанокomпозиты (НК) гидрооксида

марганца и сульфатированного арабиногалактана (НК $Mn(OH)_2/AGc$), НК гидроксида марганца и арабиногалактана (НК $Mn(OH)_2/AG$) и НК гидроксида марганца и карагинана (НК $Mn(OH)_2/Kar$). Также в работе использовали нанокompозиты оксида меди в двух различных матрицах: нанокompозит оксида меди и арабиногалактана (НК Cu_2O/AG) и нанокompозит оксида меди и крахмала (НК Cu_2O/Kp).

Исследования проводились на растениях картофеля *Solanum tuberosum* сортов «Луговской» и «Лукьяновский» *in vitro*. Растения выращивали на среде Мурасиге-Скуга, в которой соль марганца и соль меди были заменены на марганецсодержащие и медьсодержащие нанокompозиты соответственно в тех же концентрациях, в которых вносились соли согласно прописи среды Мурасиге-Скуга. В процессе вегетации еженедельно снимали биометрические показатели растений (длина и количество листьев). В конце эксперимента определяли массу надземной и корневой части растений, а также следующие биохимические параметры, характеризующие уровень стрессовой нагрузки на растительный организм: содержание активных форм кислорода (АФК), активность антиоксидантных ферментов (АОФ) – пероксидазы и каталазы, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): диеновых коньюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) в тканях корней и листьев растений.

Ростостимулирующая активность также была изучена на семенах и проростках семян сои *Glycine max* (L.) сорта «Саяна» с повышенной холодо- и заморозкоустойчивостью. Семена сои подвергали инфицированию фитопатогеном *P. carotovorum*, далее осуществляли нанопрайминг в течение 30 мин с применением водных растворов НК. Спустя 7 сут проращивания семян анализировали биометрические показатели проростков: длина и масса гипокотили и корня, а также биохимические критерии: содержание АФК, активность АОФ, количество продуктов ПОЛ в тканях гипокотили и корня проростков.

В работе использовали бактерии *P. carotovorum*, штамм бактерий ВКМ В-1274 и *C. sepedonicus*, штамм Ac-1405, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пушкино, Московская область. Влияние НК на жизнеспособность бактерий оценивали по влиянию на прирост бактериальной суспензии и количество мертвых клеток в ней, воздействию на интенсивность биопленкообразования, на функционирование дегидрогеназ, наличие бактерицидного эффекта.

Результаты и обсуждение. Было выявлено, что по отношению к фитопатогенным бактериям не все исследуемые НК обладают выраженным антибактериальным эффектом. Так, отмечен яркий бактериостатический и антибиопленочный эффект у НК $Mn(OH)_2/AGc$ и НК $Mn(OH)_2/AG$ в концентрации 0,000625 % НЧ в конечном растворе по отношению к *C. sepedonicus*. Медьсодержащие НК угнетали жизнеспособность этой бактерии только в концентрации, увеличенной в 10 раз (0,00625 %). НК $Mn(OH)_2/Kar$ и НК Cu_2O/Kp наоборот стимулировали рост и развитие бактерий. Обнаружено, что под влиянием НК деформировалась клетка бактерии, она утолщалась и укорачивалась. В

дальнейшем бактериальная клетка разрывалась, что подтверждено результатами микроскопии с применением витальных красителей.

Ангибактериальное воздействие на фитопатоген *P. carotovorum* выявлено только у НК Mn(OH)₂/Ag, снижался прирост бактерий, их биопленкообразование и дегидрогеназная активность. НК Cu₂O/Ag снижал интенсивность прироста пектобактерий.

В серии вегетационных экспериментов с картофелем было обнаружено, что выращивание растений на среде с НК не оказывало негативного эффекта на их жизнеспособность. НК Mn(OH)₂/Ag, НК Mn(OH)₂/Кар и НК Cu₂O/Ag, НК Cu₂O/Кр наоборот стимулировали рост и развитие картофеля *in vitro*, снижая показатели стрессовой нагрузки на них даже при заражении *C. sepedonicus*. Обнаружено, что под влиянием НК увеличивалось содержание фотосинтетических пигментов в тканях листьев картофеля, повышался уровень активности АОФ, отмечено уменьшение содержания продуктов ПОЛ.

Результаты показали, что НК Mn(OH)₂/Ag и НК Cu₂O/Ag оказывали ростостимулирующий эффект на морфометрические показатели корня проростков сои, активизируя активность антиоксидантных ферментов, достоверно снижая количество ДК в тканях корня. Нанопрайминг снижал негативный эффект фитопатогена *P. carotovorum* на физиолого-биохимические показатели проростков сои. Кроме того, НК Mn(OH)₂/Ag значительно стимулировал прорастание семян сои, как свободных от инфекции, так и зараженных *P. carotovorum*.

Таким образом, на основе проведенного комплексного исследования было выявлено, что среди ряда исследуемых НК наиболее эффективными против фитопатогенов и одновременно, стимулирующими рост растений веществами, являются НК Mn(OH)₂/Ag и НК Cu₂O/Ag. Полученные результаты могут представлять интерес для применения НК в области сельскохозяйственных технологий, в частности разработки новых ростостимуляторов растений.

УДК 57.052+577.29

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ФЕНИЛПРОПАНОИДНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ПУТИ *ORIGANUM VULGARE* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СОЛЕВОГО СТРЕССА

О. Б. Поливанова, В. А. Бедарев

*Российский государственный аграрный университет –
МСХА им. К. А. Тимирязева, г. Москва, Россия
polivanovaoks@gmail.com*

The general phenylpropanoid metabolic pathway genes play an important role in the accumulation of valuable secondary metabolites of medicinal plants. In this work, we consider the effect of salt stress on the expression of the PAL C4H and 4CL genes of the medicinal plant *Origanum vulgare*.

Origanum vulgare – травянистое растения семейства яснотковые, содержащее такие классы вещества, как полифенолы (флавоноиды и фенольные кислоты), терпеноиды и стеролы, а также компоненты эфирных масел (карвакрол и тимол, линалоол и п-цимол). *Origanum vulgare* широко используется в традиционной медицине и кулинарии, что вызывает растущий интерес к разработке новых фармацевтических препаратов на основе этого лекарственного растения. Многочисленные исследования демонстрируют, что экстракты *Origanum vulgare* обладают противомикробными, противовирусными, противовоспалительными, спазмолитическими, антиуролитическими, антипролиферативными и нейропротекторными свойствами [1]. Высокая биологическая активность *Origanum vulgare* базируется на многообразии его вторичных метаболитов, прежде всего полифенолов. В основе многообразия растительных вторичных метаболитов лежит фенилпропаноидный метаболический путь, в результате функционирования которого из фенилаланина образуются фенольные соединения. Начальные стадии, катализируемые фенилаланинаммиакиазой (PAL), циннамат-4-гидроксилазой (C4H) и 4- кумароил-КоА-лигазой (4CL), необходимы для образования фенилпропаноидных мономеров, которые составляют основу всех образующихся фенольных соединений [3].

Продукты центрального фенилпропаноидного метаболического пути задействованы в процессах, связанных с ростом и развитием растений и реакциями на воздействие внешних стимулов, в том числе стрессовых факторов, таких как засуха, засоление, изменение освещения, нехватка компонентов минерального питания и воздействие патогенов. Изучение биохимических и молекулярных основ пути биосинтеза фенилпропаноидов лекарственных растений, в частности *Origanum vulgare*, может быть полезно в прикладных исследованиях, направленных получения культур-суперпродуцентов целевых вторичных метаболитов как *in vivo*, так и *in vitro*.

Была произведена оценка уровней экспрессии генов центрального фенилпропаноидного метаболического пути (PAL, C4H, 4CL) *Origanum vulgare* в

ответ на воздействие солевого стресса. Растения подвергались воздействию солевого стресса (добавление 250 mM NaCl) в течение 12 и 24 ч. После этого производилась экстракция РНК с целью последующего определения уровней экспрессии генов центрального фенилпропаноидного метаболического пути методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Данные экспрессии генов были количественно оценены путем определения значения Ct для каждой реакции и нормализованы с использованием уровня экспрессии гена домашнего хозяйства актина и относительно уровня экспрессии контрольных растений. Результаты представлены на рис. 1.

При культивировании растений *Origanum vulgare* в условиях повышенного содержания NaCl отмечается увеличение уровней экспрессии всех трёх генов. Для PAL отмечается значительное увеличение экспрессии после 24 ч воздействия. Для C4H и 4CL экспрессия выше по сравнению с контролем, но существенно не различается после 12 и 24 ч воздействия.

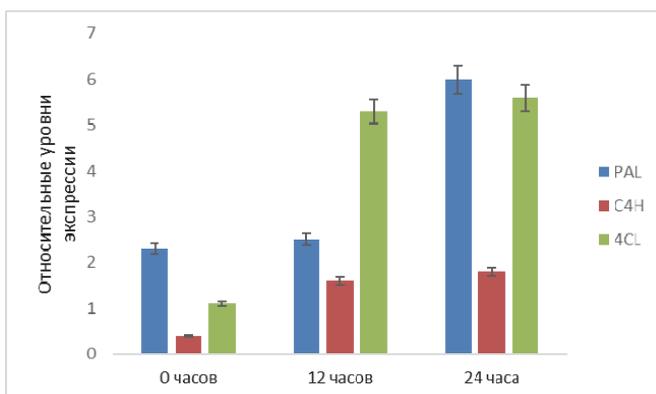


Рис. 1. Уровни экспрессии генов центрального фенилпропаноидного метаболического пути *Origanum vulgare* в ответ на воздействия солевого стресса

Гены PAL, C4H и 4CL являются центральной точкой регуляции всего фенилпропаноидного метаболического пути и, таким образом, быстро реагируют на начальных этапах воздействия стрессовых факторов. Например, было показано, что стресс, вызванный соленостью, индуцирует экспрессию ключевых генов, кодирующих PAL, у двух видов *Salvia* и, как следствие, увеличивает активность PAL и общее накопление фенолов [2]. Полученные в данной работе результаты также согласуются с другими данными, которые в целом демонстрируют увеличение транскрипционной активности генов центрального фенилпропаноидного метаболического пути в ответ на различные стрессовые факторы и, как следствие, повышение накопления в растениях вторичных метаболитов фенольной природы [2].

Список литературы

1. Поливанова О. Б., Чередниченко М. Ю. Регуляция и метаболическая инженерия центрального фенилпропаноидного метаболического пути в ответ на воздействие стрессовых факторов у растений // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2023. № 5. С. 42–48.
2. Molecular characterisation of PAL gene family reveals their role in abiotic stress response in lucerne (*Medicago sativa*) / Y. Feng, Q. Huang, R. Zhang, J. Li, K. Luo, Y. Chen // Crop & Pasture Science. 2022. Vol. 73. P. 300–311.
3. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: chemical composition and biological studies / I. Oniga [et al.] // Molecules. 2018. Vol. 23, N 8. P. 2077.
4. Phenylalanine ammonia lyase isolation and functional analysis of phenylpropanoid pathway under salinity stress in *Salvia* species / M. Valifard, S. Mohsenzadeh, A. Niazi, A. Moghadam // Australian Journal of Crop Science. 2015. N 9. P. 656–665.

УДК 574.626

ОБОГАЩЕНИЕ ЛИЧИНОК МУХ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ СЕМЕЙСТВА ОМЕГА-3

К. Н. Стоянов

Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия
ikirill97@gmail.com

The study of fatty acid content and composition in the larvae of two fly species grown on feeds with different omega-3 PUFA content.

Аквакультура представляет собой быстро развивающийся сектор сельского хозяйства. За последние пять десятилетий ее вклад в мировой рынок морепродуктов вырос с 4 до 46 % [2]. В настоящее время эта отрасль сталкивается с острой проблемой – нехваткой кормов. Высококачественные корма базируются на уловах дикой рыбы, стоимость которых непрерывно растёт. Для обеспечения дальнейшего устойчивого роста аквакультуры становится необходимым поиск альтернативных источников корма. Насекомые стали перспективным источником белка для рыб, однако они часто не удовлетворяют требованиям по составу питательных веществ, в частности по содержанию жирных кислот (ЖК) [1]. Рыбий жир, богатый омега-3 полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), контрастирует с преобладанием омега-6 ПНЖК в жире наземных насекомых. В связи с этим большое значение приобретают исследования по модификации липидного состава личинок насекомых с целью повышения содержания в них омега-3 ПНЖК [3].

Цель исследования – а) определить состав и содержание жирных кислот в личинках мясной мухи *Lucilia sericata* и черной львинки *Hermetia illucens*, выращенных на стандартном корме и корме с добавлением масла рыжика посевного *Camelina sativa*, богатого альфа-линоленовой кислотой (АЛК, 18:3n-3); б) проанализировать аминокислотный (АК) состава личинок этих видов мух.

Было проведено два независимых эксперимента по выращиванию личинок мух на стандартном корме и корме богатом АЛК. Анализ жирных кислот проводили на газовом хроматографе, оснащённом масс-спектрометрическим детектором. Оценка аминокислотного состава была выполнена с помощью жидкостной хроматографии. Состав АК исследуемых личинок мух, как и других насекомых отряда Diptera, был очень близок к составу рыбной муки. В обоих экспериментах у личинок, выращенных на стандартном корме, состав и содержание ЖК характеризовались низким соотношением омега-3/омега-6 ПНЖК, в основном преобладали 18:1n-9 и 18:2n-6. Однако введение в рацион мух рыжикового масла изменило соотношение омега-6/омега-3 ПНЖК до приемлемых даже для человека значений, в основном за счет увеличения содержания АЛК. Это свидетельствует о том, что состав и содержание ЖК в личинках *L. sericata* и *H. illucens* могут существенно изменяться под влиянием рациона питания.

Список литературы

1. Barroso F. G. The potential of various insect species for use as food for fish. Aquaculture. 2014. P. 422–423.
2. FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO, Rome, 2020. 206 p.
3. Dietary enrichment of edible insects with omega 3 fatty acids / D. G. A. B. Oonincx [et al.] // Insect Science. 2020. N 27. P. 500–509.

УДК 619:631.453:599.323.4

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НАА

А. Н. Шевченко

*Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина,
г. Краснодар, Россия
veterinary@kubsau.ru*

The results of determining the acute toxicity of the NAA feed additive are presented.

Актуальность темы. На рост, развитие, продуктивность птицы решающее влияние оказывает полноценное кормление [1].

На сегодняшний день для улучшения полноценности рационов для птицы, вводят различные кормовые добавки и биологически активные вещества [2–4]. Эти добавки должны быть безопасными, не депонироваться в организме.

Поиск новых кормовых добавок, способных обеспечить потребность птицы в витаминах, минеральных веществах и которые необходимы для полноценного роста и развития птицы является актуальной проблемой сегодняшнего дня.

Целью наших исследований являлось изучить токсикологическое действие кормовой добавки НАА.

Кормовая добавка НАА представляет собой жидкость со слегка зеленоватым оттенком. В состав кормовой добавки входит раствор полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ-ГХ) и отвар Melissa. Препараты ПГМГ-ГХ характеризуются антимикробной, антивирусной, инсектицидной активностью, одновременно воздействуют на аэробную и анаэробную микрофлору, обладают пролонгированным биоцидным действием. В состав белковых молекул гуанидиновых соединений входит аминокислота аргинин, фолиевая кислота, многочисленные белки и нуклеиновые кислоты. Различные производные гуанидина применяют в качестве физиологически активных кислот. Так же в состав кормовой добавки входит отвар Melissa, который содержит флавоноиды, дубильные вещества и фенольные кислоты. Основные составляющие отвара Melissa – это розмариновая кислота и эвгенол. Розмариновая кислота обладает успокаивающим действием, а эвгенол – это мощный антиоксидант [5].

Материал и методы исследований. Определение острой токсичности кормовой добавки НАА определяли на белых беспородных крысах и белых беспородных мышах путем внутрижелудочного введения. При введении кормовой добавки в желудок использовали шприц и иглы с наплавленной оливой.

За 12 дней до начала эксперимента животных выдерживали в карантине. Условия содержания всех групп были одинаковыми.

Результаты исследований. Результаты, полученные в опыте, представлены в таблице.

За животными наблюдали в течение 14 дней. Различий в поведении крыс и мышей всех групп не установлено. По результатам опыта сохранность лабораторных животных во всех группах составила 100 %. При вскрытии животных патологоанатомических изменений не выявлено.

Таблица 1

Определение токсичности кормовой добавки НАА при внутрижелудочном введении

Группа	Вид животных	Кол-во животных	Доза препарата, мл	Выжило	Пало
1 (интактная)	мыши	20	-	20	0
	крысы	20	-	20	0
2 (контрольная)	мыши	20	0,6 физраствора	20	0
	крысы	20	5,0 физраствора	20	0
3(опытная)	мыши	20	0,2	20	0
	крысы	20	2,0	20	0
4(опытная)	мыши	20	0,4	20	0
	крысы	20	4,0	20	0
5(опытная)	мыши	20	0,6	20	0
	крысы	20	5,0	20	0

Вывод. При проведении опыта по определению острой токсичности кормовой добавки НАА не удалось определить как ЛД-50 (среднюю смертельную дозу), так и пороговую зону, при которой в организме был бы зафиксирован статистически достоверный сдвиг какого-либо специфического показателя.

Список литературы

1. Николаев С. Н. Совершенствование кормления сельскохозяйственных животных и птицы в условиях Нижнего Поволжья // Эколого-мелиоративные аспекты рационального природопользования : материалы Междунар. науч.-практ. конф. Волгоград, 2017. С. 313–317.
2. Плотников С. А., Шевченко А. Н. Влияние разных доз кормовой добавки АА-50 на зоотехнические показатели выращивания цыплят-бройлеров // Тенденции развития науки и образования. 2022. № 86-5. С. 156–158.
3. Шевченко А. Н., Ходаев Д. В. Влияние кормовой биологически активной добавки АА-50 на зоотехнические показатели выращивания мясных гусей // Тенденции развития науки и образования. 2022. № 87-2. С. 128–130.
4. Шпынова С. А., Семена Т. В. Эффективность включения сапропела в комбикорм перепелов-несушек // Перспективы производства продуктов питания нового поколения : материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. памяти проф. Сапрыгина Г. П. Омск, 2017. С. 171–174.
5. Патент № 2787022 С1 Российская Федерация, МПК А23К 50/75. Способ применения кормовой добавки при выращивании цыплят-бройлеров : № 2022123199 : заявл. 29.08.2022 : опубл. 28.12.2022 / А. Н. Шевченко ; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина».
6. Руководство по оптимизации рецептов комбикормов для сельскохозяйственной птицы / В. И. Фисинин [и др.]. 2-е изд., дораб. и доп. Сергиев Посад : Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т птицеводства, 2014. 155 с.

Научное издание

РАЗВИТИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ, БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ
IV ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ, ПОСВЯЩЁННОЙ 45-ЛЕТИЮ КАФЕДРЫ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ, БИОИНЖЕНЕРИИ
И БИОИНФОРМАТИКИ ИГУ

Иркутск, 25–27 октября 2023 г.

ISBN 978-5-9624-2199-5

Материалы публикуются в авторской редакции

Темплан 2023. Поз. 100
Уч. -изд. л. 14,3

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИГУ
664082, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124