

ВЕСЦІ

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2016 № 3

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2016 № 3

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 1956 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

ЗМЕСТ

От редакции	4
Гарановіч І. М., Македонская Н. В., Архаров А. В., Блінковскі Е. Д. Использование биогумуса для выращивания саженцев древесных интродуцентов	5
Шыш С. Н. Специфика влияния экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты и электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на ростовые процессы и состав масла чернушки посевной (<i>Nigella sativa</i> L.)	9
Арашкова А. А., Гончарова И. А., Мицкевич А. Г., Костеневич А. А., Шарич Т. В. Грибы рода <i>Aspergillus</i> в очагах плесневого поражения жилых и общественных помещений	13
Кузмицкая П. В., Урбанович О. Ю. Генетический полиморфизм и распространенность вируса мозаики яблони в садах Беларуси	17
Гомель К. В., Хейдорова Е. Э., Никифоров М. Е. Анализ внутривидовой структуры кулика-сороки на основании молекулярно-генетических данных и пути его расселения на территории Беларуси	23
Дремук И. А., Савина С. М., Вязов Е. В., Адамчик К. О., Козел Н. В. Содержание глутатиона и активность глутатионредуктазы в клетках <i>Spirulina platensis</i> при светодиодном освещении с разным спектральным составом	29
Зубей А. В. Промысловые рыбы субфосильной коллекции археологического памятника Витебск, Верхний замок (р. Западная Двина)	33
Винцек Е. В., Григорчик А. П. Возрастная изменчивость пищевого рациона бычка-песочника <i>Neogobius fluviatilis</i> (Pallas, 1814) в реке Днепр (Беларусь)	41
Карлионова Н. В., Лучик Е. А. Влияние климатических факторов на фенологию весенней миграции и гнездования чибиса (<i>Vanellus vanellus</i>) на юге Беларуси	46
Кришук И. А., Гайдученко Е. С., Хейдорова Е. Э. Особенности генетического разнообразия обыкновенной бурозубки (<i>Sorex araneus</i>) на территории Беларуси	52

Салавей І. А. Структура асамблеі соў <i>Strigiformes</i> пры павелічэнні антрапагеннай трансфармацыі прыродных комплексаў	57
Емельянова А. В. 5-Аминолевулиновая кислота как индуктор накопления антоцианов в растениях озимого рапса (<i>Brassica napus</i>)	66
Канах Ю. С. Активность белков-транспортеров в эритроцитах человека при действии N-ацетил-L-цистеина	70
Карасева Е. Н., Янчевская Т. Г. Активность пероксидаз как показатель стрессоустойчивости у <i>Dioscorea alata</i> L.	76
Муратова А. А., Мандрик-Литвинкович М. Н., Носонова Т. Л., Валентович Л. Н., Коломиец Э. И., Титок М. А. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий <i>Pseudomonas brassicacearum</i> БИМ В-446	81
Мялик А. Н. Европейский географический элемент во флоре Припятского Полесья	85
Нагорный Р. К., Самсонова А. С., Глушень Е. М. Эффективность очистки абсорбционных растворов от триэтиламина и диметилэтиламина микробным препаратом «Тэамин»	90
Плотникова Д. Т., Сидоренко А. В., Новик Г. И. Изучение антибиотикоустойчивости бактерий родов <i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> и <i>Leuconostoc</i>	94
Полетаев А. С. Анализ кариотипов карасей в условиях Беларуси	101
Скоробогатова А. С. Воздействие ионов алюминия на эритроциты человека	105
Чирикова М. С. Влияние микроорганизмов – деструкторов жировых веществ на биоценоз активного ила	110
Водчиц Н. В. Применение ISSR-маркеров для генетической паспортизации и сертификации растений рода <i>Vaccinium</i>	115
Тарасевич А. Ю. Ферментативная активность почвы, загрязненной дизельным топливом, при внесении биомелиорантов	121
Правила для авторов	127

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2016 № 3

Серия биологических наук

На русском, белорусском и английском языках

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 395 от 18.05.2009

Тэхнічны рэдактар *В. А. Тоўстая*

Камп'ютарная вёрстка *В. Л. Смольскай*

Здадзена ў набор 29.06.2016. Падпісана да друку 14.07.2016. Выхад у свет 27.07.2016. Фармац 60×84¹/₈.

Папера афсетная. Друк лічбавы. Ум. друк. арк. 14,88. Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 82 экз. Заказ 144.

Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 10,28 руб.; ведамасная падпіска – 25,21 руб.

Выдавец і паліграфічнае выкананне:

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». Пасведчанне аб дзяржаўнай рэгістрацыі выдаўца, вытворцы, распаўсюджвальніка друкаваных выданняў № 1/18 ад 02.08.2013.

ЛП 02330/455 ад 30.12.2013. Вул. Ф. Скарыны, 40, 220141, г. Мінск.

© Выдавецкі дом «Беларуская навука».
Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2016

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES 2016 N 3

FOUNDED IS THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

The Journal has been published since January 1956

Issued four times a year

CONTENTS

From the editors	4
Garanovich I. M., Makedonskaya N. V., Arkharov A. V., Blinkovski E. D. Using of biohumus seedlings of woody plant introductions	5
Shysh S. N. The specific effect of exogenous 5-ALA and millimeter range EMR on the growth processes and the oil composition of nigella seed (<i>Nigella sativa</i> L.)	9
Arashkova A., Gontcharova I., Mitskevich A., Kastsianeich A., Sharych T. Fungi of the genus <i>Aspergillus</i> in mould damaged dwellings and public buildings	13
Kuzmitskaya P. V., Urbanovich O. Yu. Genetic polymorphism and Apple mosaic virus prevalence in the gardens of Belarus	17
Homel K., Kheidorova E., Nikiforov M. Analysis of the intraspecific structure of Eurasian oystercatcher on the basis of molecular data and ways of his distribution on the territory of Belarus	23
Dremuk I. A., Savina S. M., Viazau Y. V., Adamchik K. O., Kozel N. V. Glutathione content and glutathione reductase activity in <i>Spirulina platensis</i> cells under led lighting with different spectral compositions	29
Zubei A. V. Commercial fish of subfossil collection of archaeological site Vitebsk, Upper Castle (r. Zapadnaya Dvina)	33
Vintsek E. V., Hryhorchuk A. P. Age variability in the diet of monkey goby <i>Neogobius fluviatilis</i> (Pallas, 1814) in the Dnieper river (Republic of Belarus)	41
Karlionova N., Luchik E. Influence of climate factors on phenology of spring migration and breeding phenology of lapwing (<i>Vanellus vanellus</i>) in the south of Belarus	46
Kryshchuk I., Gajduchenko H., Kheidorova E. Particularities of common shrew (<i>Sorex araneus</i>) genetic diversity on the territory of Belarus	52
Solovey I. A. Changes in species and size structure assemblage of owls <i>Strigiformes</i> in the direction of increasing anthropogenic transformation natural complexes	57
Yemelyanova A. V. 5-Aminolevulinic acid as inductor of anthocyanin accumulation in plants of winter rape (<i>Brassica napus</i>)	66
Kanash J. S. Activity protein transporters in human erythrocytes under N-acetyl-L-cysteine action	70
Karaseva E. N., Yanchevskaya T. G. Activity peroxidases as an indicator stress have <i>Dioscorea alata</i> L.	76
Muratova A. A., Mandryk-Litvinkovich M. N., Nasonova T. L., Valentovich L. N., Kolomiets E. I., Titok M. A. Molecular genetic analysis of the determinants associated of antimicrobial properties of bacteria <i>Pseudomonas brassicaearum</i> BIM B-446	81
Mialik A. M. European geographical element in the flora of the Prypiackaje Paliessie	85
Nagorny R., Samsonova A., Hlushen E. Cleaning efficiency of absorption solution from triethylamine and dimethylamine by microbial preparation Teamine	90
Plotnikava D., Sidorenko A., Novik G. Evaluation of antibiotic resistance of bacteria from genera <i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Leuconostoc</i>	94
Poletaev A. Analysis of <i>Carassius</i> karyotypes in Belarus	101
Skorobohatova A. Aluminum effects on human erythrocytes	105
Chyrykava M. S. Effect microbial cultures degrading lipid compounds on biocenosis of activated sludge	110
Vodchits N. V. The assessment of ISSR markers application to genetic typing and certification of <i>Vaccinium</i> plants ...	115
Tarasevich A. Ju. Enzymatic activity in the diesel fuel contaminated soil with bioameliotants	121
Rules for the authors	127

ОТ РЕДАКЦИИ

Уважаемые авторы и читатели журнала!

Спасибо, что вы с нами и что высокий научный уровень ваших публикаций делает наше издание интересным и востребованным.

Со своей стороны редакция также стремится не останавливаться на достигнутом и предпринимает все возможное, чтобы журнал развивался и был современным.

Вы уже знаете, что «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук» входят в «Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований».

В 2015 г. журнал был включен в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ). Теперь вы имеете возможность с помощью инструментов и сервисов, доступных для вас на платформе eLIBRARY.RU (раздел «Личный кабинет»), самостоятельно корректировать список своих публикаций и цитирований в РИНЦ, следить за анализом своей публикационной активности и т. д.

В этом году нами предприняты шаги по включению журнала в глобальный индекс цитирования Scopus, что расширит возможности представления исследований белорусских ученых для мировой научной общественности и повысит показатели цитируемости наших авторов. В связи с этим изменяются требования к оформлению статей, которые направляются для опубликования. С новыми «Правилами для авторов» вы можете ознакомиться либо в конце журнала, либо на сайте belnauka.by.

Надеемся на плодотворное сотрудничество!

УДК 581.14:631.8

И. М. ГАРАНОВИЧ, Н. В. МАКЕДОНСКАЯ, А. В. АРХАРОВ, Е. Д. БЛИНКОВСКИЙ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОГУМУСА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ САЖЕНЦЕВ ДРЕВЕСНЫХ ИНТРОДУЦЕНТОВ

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: bel.dendr@gmail.com*

Показано положительное влияние биогумуса в составе субстрата на рост и развитие саженцев декоративных древесных растений.

Ключевые слова: биогумус, рост и развитие, декоративные древесные растения.

I. M. GARANOVICH, N. V. MAKEDONSKAYA, A. V. ARKHAROV, E. D. BLINKOVSKI

USING OF BIOHUMUS SEEDLINGS OF WOODY PLANT INTRODUCTIONS

*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: bel.dendr@gmail.com*

There has been shown a positive impact of biocompost in the composition of substrate on growth and development of seedlings of ornamental woody plants.

Keywords: biocompost, growth and development, ornamental woody plants.

Введение. Современные технологические приемы репродукции и выращивания посадочного материала декоративных древесных растений направлены на интенсификацию процессов их роста и развития. С экологической точки зрения как качество продукции, так и экологическую безопасность обеспечивают преимущественно органические удобрения и субстраты [1]. В этой связи особая роль отводится биогумусу, использование которого в декоративном садоводстве изучено недостаточно.

Цель работы – изучить влияние различных субстратов, в основном на основе биогумуса, на рост и развитие саженцев декоративных древесных растений.

Материалы и методы исследования. Биогумус (вермикомпост) – новое качественное органическое комплексное удобрение, являющееся продуктом переработки органических отходов популяцией дождевого червя «Старатель» [2]. Он представляет собой концентрированное удобрение в виде сыпучей мелкогранулированной массы темно-коричневого цвета, которая содержит в сбалансированном сочетании целый комплекс необходимых питательных веществ и микроэлементов, большое количество гуминовых веществ, ферменты, почвенные антибиотики, витамины, гормоны роста и развития растений [3–5]. Это также и микробиологическое удобрение, в котором обитает уникальное сообщество микроорганизмов, создающих почвенное плодородие. Биогумус не содержит патогенную микрофлору, яйца гельминтов, цисты патогенных простейших, личинки синантропных мух, семена сорняков. Удобрение легко и постепенно усваивается растениями в течение всего цикла их развития. Биогумус используется как органическое удобрение при посадке, подкормке всех видов сельскохозяйственных культур, в лесоводстве, цветоводстве, а также при реанимации и рекультивации почв [6–8] и является удобрением пролонгированного действия [9].

Активизатор почвы препарат ЭридГроу является мелиорантом-почвоулучшителем и представляет собой натуральный высококонцентрированный продукт, полученный в результате

переработки торфа по специальной технологии ЭридГроу. Последующая физико-химическая модификация позволила придать ему требуемые потребительские свойства и применять его в качестве органического удобрения для подкормки выращиваемых цветочных и декоративных культур. Препарат стимулирует рост и развитие растений, улучшает их декоративные качества, ускоряет и продлевает сроки бутонизации и обильного цветения, придает яркость окраске цветов и листьев, способствует увеличению размеров растений, образованию большего количества новых побегов и ветвлению, повышает устойчивость к заболеваниям и увяданию.

Серия опытов по испытанию влияния грунтов на основе биогумуса на рост и развитие саженцев декоративных древесных растений проведена в соответствии с рекомендациями, изложенными в работе [10].

В качестве объектов исследования использованы сеянцы и укорененные черенки декоративных древесных растений, популярных в зеленом строительстве.

Морфологические параметры растений устанавливали путем замера высоты, длины побегов и корней.

Данные обрабатывали с помощью методов биологической статистики и компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Укорененные черенки спиреи Вангутта и можжевельника казацкого пестролистного высаживали в условиях полевого опыта в субстраты различного состава (табл. 1). Контролем служила минеральная почва питомника. Активизатор почвы в разведении 1:100 вносили с интервалом 14 дней в виде трехкратного полива.

Активизатор почвы и биогумус влияли на рост саженцев спиреи в высоту примерно одинаково (увеличение составило до 44,7 %). Средняя длина корневых систем во всех вариантах опыта увеличилась до 35,6 %. В большинстве вариантов существенно выше прирост (до 19,5 %).

В практическом отношении вполне удовлетворительна концентрация биогумуса 1:5.

Таблица 1. Влияние биогумуса на рост и развитие саженцев декоративных древесных растений

Вариант	Максимальная высота, см	Длина корневой системы, см			Прирост, см	
		max	$\bar{X} \pm st$	t_{st}	$\bar{X} \pm st$	t_{st}
<i>Спирея Вангутта</i>						
Контроль	38,0	25,0	17,7 ± 2,1	–	25,8 ± 1,8	–
Активизатор почвы	55,0	25,0	20,5 ± 1,8	2,9	27,3 ± 2,3	2,1
Биогумус 1:1	50,0	29,0	20,8 ± 1,7	2,8	30,4 ± 3,1	3,7
Биогумус 1:3	55,0	30,0	24,0 ± 2,4	3,4	20,8 ± 3,2	2,9
Биогумус 1:5	50,0	25,0	21,0 ± 1,7	2,9	30,8 ± 2,8	2,8
<i>Можжевельник казацкий пестролистный</i>						
Контроль	18,0	15,0	13,6 ± 1,4	–	11,6 ± 1,2	–
Активизатор почвы	22,0	15,0	11,4 ± 1,2	2,9	11,4 ± 1,3	1,1
Биогумус 1:1	22,0	27,0	20,6 ± 1,8	3,7	13,2 ± 1,3	2,8
Биогумус 1:3	22,0	15,0	12,6 ± 1,3	2,8	12,6 ± 1,2	2,9
Биогумус 1:5	20,0	16,0	12,6 ± 1,7	2,9	10,4 ± 1,1	2,8

Влияние препаратов на рост и развитие можжевельника казацкого пестролистного менее эффективно. Во всех вариантах высота растений увеличилась до 22,2 %. Длина корневой системы больше лишь при использовании биогумуса в соотношении 1:1 (на 80,0 %). Прирост побегов больше, чем в контроле, в вариантах с биогумусом в соотношении 1:1 и 1:3 (8,6–13,8 %). В опытных вариантах, однако, максимальное увеличение длины корневой системы у отдельных растений составило до 80,0 %. В то же время в среднем этот показатель значительно меньше, чем в контроле.

В табл. 2, 3 представлены данные по влиянию биогумуса на рост и развитие сеянцев и укорененных черенков сирени обыкновенной.

Максимальная высота сеянцев на субстрате с использованием торфа и навоза 18,9 см. По эффективности субстрат с биогумусом стоит на втором месте (12,7 см). В опытных вариантах количество боковых побегов меньше, чем в контроле. То есть на фоне более интенсивного роста формировалось меньшее количество побегов.

Укорененные черенки сирени на субстрате с биогумусом дали максимальный прирост и были даже несколько выше, чем при использовании навоза. Во всех вариантах опытов формировалось большее количество побегов.

Таблица 2. Биометрические показатели двулетних сеянцев сирени обыкновенной

Вариант опыта	К-во побегов		Прирост текущего года, см	
	$\bar{X} \pm st$	t_{st}	$\bar{X} \pm st$	t_{st}
<i>Сеянцы</i>				
Контроль (торф)	4,0 ± 0,3		7,2 ± 0,3	
Торф + биогумус (2:1)	2,3 ± 0,2	-4,4*	12,7 ± 0,7	5,1*
Торф + навоз (2:1)	3,8 ± 0,4	-0,9	8,6 ± 0,4	2,9*
Торф + мин. почва + навоз (1:1:1)	2,5 ± 0,1	-3,8*	18,9 ± 1,0	8,8*
<i>Черенки сорта Аэлита</i>				
Контроль (мин. почва)	1,0 ± 0,1		4,0 ± 0,2	
Торф	1,6 ± 0,2	3,3*	5,3 ± 0,4	2,9*
Торф + биогумус (2:1)	3,0 ± 0,2	4,2*	8,6 ± 0,6	5,9*
Торф + навоз (2:1)	3,8 ± 0,4	5,6*	6,6 ± 0,3	3,5*
Торф + перлит (2:1)	3,0 ± 0,3	3,8*	4,7 ± 0,5	1,2*
Торф + перлит + навоз (1:1:1)	2,6 ± 0,2	3,5*	8,3 ± 0,5	5,4*
<i>Черенки сорта Минская красавица</i>				
Контроль	1,0 ± 0,1		4,1 ± 0,3	
Торф + биогумус (2:1)	2,6 ± 0,2	4,8	7,1 ± 0,7	4,2

Примечание. * – статистически значимые различия с контролем (по *t*-критерию Стьюдента) при $p < 0,05$.

Таким образом, установлено положительное влияние биогумуса в субстрате на развитие сеянцев сирени (прирост в 2,5 раза больше). Еще более эффективен биогумус в составе субстрата при доращивании укорененных черенков сортовой сирени.

Изучено также влияние биогумуса на рост укорененных черенков вейгелы гибридной. В качестве субстрата использовали смесь торфа, дерновой земли, песка и вермикомпоста в соотношении 1:2:1:1. Данной смесью наполняли контейнеры объемом 2 л. Укорененные черенки вейгелы гибридной высаживали в начале мая. Контрольные растения высаживали в смесь торфа, дерновой земли, песка в соотношении 1:2:1.

Таблица 3. Относительные различия с контролем биометрических показателей двулетних саженцев сирени обыкновенной в зависимости от вида субстрата, %

Вариант опыта	К-во побегов	Прирост текущего года, см
<i>Сеянцы</i>		
Торф + биогумус (2:1)	-42,5	+76,4
Торф + навоз (2:1)	–	+19,4
Торф + мин. почва + навоз (1:1:1)	-37,5	+162,5
<i>Черенки сорта Аэлита</i>		
Торф	+60,0	+32,5
Торф + биогумус (2:1)	+200,0	+115,0
Торф + навоз (2:1)	+280,0	+65,0
Торф + перлит (2:1)	+200,0	–
Торф + перлит + навоз (1:1:1)	+160,0	+107,5
<i>Черенки сорта Минская красавица</i>		
Торф + биогумус (2:1)	+160,0	+73,2

Примечание. Прочерк означает отсутствие статистически значимых различий (по *t*-критерию Стьюдента) с эталонным сортом при $p < 0,05$.

Произведенные в конце вегетационного периода замеры показали, что двулетние саженцы вейгелы имели высоту 33,4 см, в то время как в контроле – 24,2 см, т. е. вермикомпост оказал положительное влияние на рост вейгелы. В среднем прирост по сравнению с контролем увеличился на 9,2 см (38 %).

Изучено также влияние биогумуса на всхожесть семян сирени пекинской. Посев производили в начале мая. Дно посевных борозд устилали вермикомпостом из расчета 200 г/м п. Семена высевали через 3–5 см на глубину около 2–3 см. Заделку посевов производили дерновой землей. Контроль – посев в дерновой земле.

Всхожесть составила в опытном варианте 46 % (в контроле – 43 %), средний прирост составил соответственно 5,2 и 4,1 см.

Как видим, существенное влияние на всхожесть подкормка вермикомпостом не оказала, в то время как прирост сеянцев увеличился на 1,1 см (26 %).

Положительное влияние биогумус оказал и на рост саженцев сирени в контейнерах. В минеральную почву питомника добавляли биогумус (1:10). Однолетние меристемные растения сирени в контейнерах в условиях открытого грунта дали прирост 4,0–5,3 см у разных сортов. В опытном варианте прирост составил 8,6–10,2 см, что до 111,6 % больше, чем в контроле.

Заключение. Показано положительное влияние биогумуса, особенно в высоких концентрациях, на рост сеянцев, укоренение черенков и саженцев декоративных древесных растений.

Саженцы спиреи Вангутта превосходили контроль по высоте (до 44 %), существенно выше был и их прирост (до 19 %). Наибольшие преимущества получали корневые системы, которые формировались более мочковатыми и более длинными.

Двулетние сеянцы сирени на субстрате с биогумусом имели прирост почти в 2 раза больший. Еще более существенным был эффект при доращивании укорененных черенков сирени. Эффективность биогумуса при доращивании черенков можжевельника была менее существенной.

Можно предположить, что действие препаратов на основе торфа и биогумуса более эффективно для растений с интенсивным ростом. Для медленно растущих, как можжевельник, это воздействие, очевидно, является пролонгированным.

Таким образом, вермикомпост – эффективное органическое удобрение, способствующее увеличению прироста декоративных культур, поэтому его следует рекомендовать к практическому использованию.

Список использованной литературы

1. Мельник, И. А. Вермикультура – новое мощное средство оздоровления окружающей среды и получения чистой сельхозпродукции / И. А. Мельник // *Зерновые культуры*. – 1963. – № 4. – С. 9–11.
2. Максимова, С. Л. Видовой состав дождевых червей и их биотопическое распределение на территории Беларуси / С. Л. Максимова, Ю. Ф. Мухин // *Вест. НАН Беларуси. Сер. биял. навук*. – 2016. – № 1. – С. 56–60.
3. Морев, Ю. Б. Дождевые черви в утилизации городских и бытовых отходов / Ю. Б. Морев, В. С. Абасов. – Бишкек: ИЛИМ, 1996. – 16 с.
4. Игонин, А. М. Биопереработка навоза с помощью технологии дождевых червей / А. М. Игонин // *Международ. агропром. журн.* – 1991. – № 5. – С. 100–104.
5. Косолапов, И. А. Эффект переработки органических отходов с помощью червей / И. А. Косолапов // *Экономика сельского хозяйства России*. – 1994. – № 12. – С. 12.
6. Игонин, А. М. Как повысить плодородие почвы в десятки раз с помощью дождевых червей. – М.: Информ.-внедр. центр «Маркетинг», 1999. – 32 с.
7. Городний, Н. М. Вермикультура и ее эффективность / Н. М. Городний, В. К. Ковалёв. – Киев: Наук. думка, 1990. – 22 с.
8. Мельник, И. А. Влияние вермикультуры и вермикомноста на плодородие почвы и развитие растений / И. А. Мельник, В. В. Ковалев // *Защита растений*. – 1991. – № 1. – С. 13–14.
9. Игонин, А. М. Вермикомпост: свойства и назначение / А. М. Игонин // *Земля России*. – 1992. – № 5. – С. 38–39.
10. Мерзлая, Т. Е. Методика и результаты исследований эффективности компостов и вермикомпостов / Т. Е. Мерзлая // *Дождевые черви и плодородие почв: материалы 2-й Международ. науч.-практ. конф.* – Владимир, 2004. – С. 39–43.

Поступила в редакцию 12.05.2016

УДК 581.17:547.426.23:582.675.1

С. Н. ШИШ

**СПЕЦИФИКА ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ
И ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА
НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ И СОСТАВ МАСЛА ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ
(*NIGELLA SATIVA* L.)**

*Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: svetlana.shysh@gmail.com*

В настоящей работе оценено влияние экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в концентрации 10^{-6} – 10^{-11} % и электромагнитного излучения (ЭМИ) в частотном диапазоне 53–78 ГГц (время воздействия 8, 12 и 20 мин) на ростовые процессы и состав масла семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.). В полевых опытах показан дозозависимый эффект действия обработок на ростовые процессы чернушки. Установлены отличия в жирнокислотном составе масла после предпосевной обработки ЭМИ и АЛК.

Ключевые слова: чернушка посевная (*Nigella sativa* L.), семена чернушки, масло чернушки, 5-аминолевулиновой кислоты, электромагнитное излучение.

S. N. SHYSH

**THE SPECIFIC EFFECT OF EXOGENOUS 5-ALA AND MILLIMETER RANGE EMR
ON THE GROWTH PROCESSES AND THE OIL COMPOSITION OF NIGELLA SEED (*NIGELLA SATIVA* L.)**

*Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: svetlana.shysh@gmail.com*

The effect of exogenous 5-ALA (concentration 10^{-6} – 10^{-11} %) and electromagnetic radiation (EMR) (53–78 GHz, the exposure time – 8, 12 and 20 min) on black cumin (*Nigella sativa* L.) growth processes and seed oil composition were estimate. In field experiments dose-dependent effect of the treatments on the growth processes of black cumin has been shown. Differences in the oil fatty-acid composition after EMR and 5-aminolevulinic acid (ALA) pre-treatment was established.

Keywords: black cumin (*Nigella sativa* L.), semen nigella, oil nigella, 5-aminolevulinic acid, electromagnetic radiation.

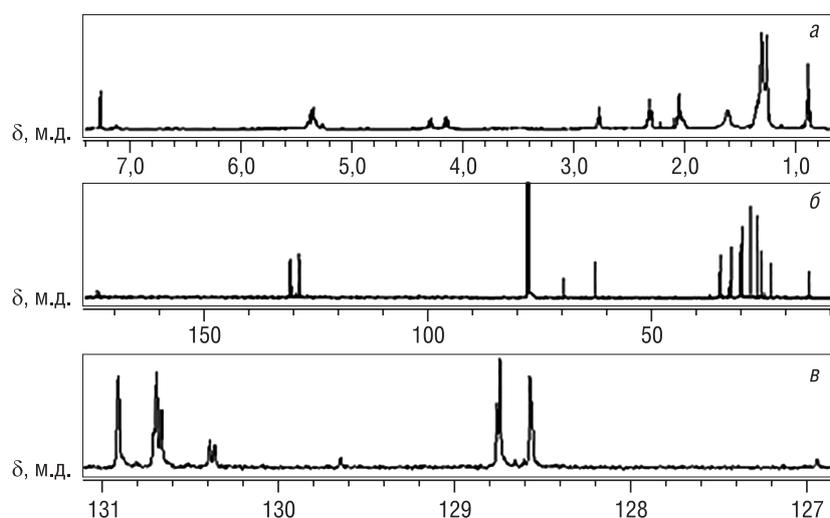
Введение. Перспективной культурой для возделывания на территории Беларуси является *Nigella sativa* L. (чернушка посевная) ввиду биологической ценности семян и масла этого растения [1]. *N. sativa*, растение сем. Лютиковые, родом из Южной и Юго-Западной Азии, Северной Африки и Южной Европы. С древнейших времен она используется в качестве важного лекарственного растения и пряности для овощей, бобовых и различных видов хлебобулочных изделий [2]. В ряде работ, посвященных исследованию состава и свойств масла *N. sativa*, приводятся данные о его благотворном влиянии на организм человека и животных [1]. На сегодняшний день описаны наиболее активные компоненты масла *N. sativa*, основными из которых являются жирные кислоты (ЖК) и характерное соединение с антиканцерогенными свойствами – тимохинон [2]. Поэтому актуальным является изучение не только способов повышения посевных качеств и ростовых процессов у *N. sativa*, произрастающей в Беларуси, но и влияния предпосевных воздействий на метаболизм ЖК и тимохинона в семенах.

Цель настоящего исследования – определение влияния экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) и электромагнитного излучения миллиметрового диапазона (ЭМИ) на ростовые процессы и состав масла *N. sativa*, произрастающей в Центральной Беларуси.

Материалы и методы исследования. В качестве стимулирующих факторов использовали экзогенную АЛК и ЭМИ, так как имеется ряд работ, подтверждающих их росторегуляторное действие [3, 4]. Концентрации были выбраны исходя из имеющихся в литературе результатов об эффективности влияния сверхнизких концентраций ряда химических соединений [5]. Предпосевная обработка семян АЛК проводилась методом инкрустации [6] в четырех рабочих концентрациях (АЛК 1 – 10^{-6} %; АЛК 2 – 10^{-7} ; АЛК 3 – 10^{-9} ; АЛК 4 – 10^{-11} %) и ЭМИ в трех режимах: Р1 (53–78 ГГц, 20 мин), Р2 (64–66 ГГц, 12 мин), Р3 (64–66 ГГц, 8 мин). Обработка ЭМИ проводилась в Институте ядерных проблем БГУ на запатентованной лабораторной установке для микроволновой обработки семян различных сельскохозяйственных культур в широком частотном диапазоне (от 37 до 120 ГГц) с плавной регулировкой мощности от 1 до 10 мВт. Для анализа были взяты семена *N. sativa*, собранные с растений, выращенных в 2014 г. на экспериментальном участке отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Перед тем как проводить экстракцию, семена измельчали в агатовой ступке. Затем 50 мг измельченных семян заливали 1 мл дейтерированного хлороформа (CDCl_3) и в закрытой емкости выдерживали в течение 12 ч. Перед записью спектров ЯМР растворы фильтровали. Готовили экстракты и записывали спектры для нескольких образцов каждого вида. Для количественного определения содержания масла его экстракцию проводили из 1 г семян.

ЯМР-спектроскопия проведена канд. хим. наук Е. Д. Скаковским в лаборатории физико-химических методов исследования ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси». Спектры ЯМР-растворов в CDCl_3 записаны на спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500 и 126 МГц для ядер ^1H и ^{13}C соответственно. Запись проводили при температуре 293 К в 5-миллиметровых стандартных ампулах. Накопление сигналов для протонных спектров осуществляли в течение 10 мин, а для углеродных – в течение 12 ч. В качестве внутреннего стандарта в случае ядер ^1H использовали сигнал CHCl_3 (примесь в CDCl_3 , $\delta = 7,27$ м. д.), для ядер ^{13}C – сигнал растворителя ($\delta = 77,7$ м. д.). Экспериментальные данные по ЯМР-анализу получены и обработаны с помощью пакета программ XWIN-NMR 3.5 [7], для статистической обработки результатов исследования использованы программы М. Excel и Stadia 8.0.

Результаты и их обсуждение. В результате ряда лабораторных экспериментов по изучению всхожести и морфометрических параметров ювенильных растений *N. sativa* установлено, что отклик растений на изучаемые воздействия зависит от агрономических качеств семян и не имеет стабильного эффекта. Отмечено, что стимулирующий эффект от ЭМИ во всех режимах и АЛК 3 наблюдается у семян *N. sativa* с низкой всхожестью (до 10 %) [8]. При всхожести 50–60 % стимулирующего эффекта нами не установлено. Показано, что в процессе роста максимальные отличия от контроля по высоте растений при действии ЭМИ и АЛК наблюдается на начальных этапах роста.



Спектры ЯМР хлороформенного экстракта семян *N. sativa*: а – ^1H , б – ^{13}C , в – ^{13}C (область двойных связей)

Установлены жирнокислотный и компонентный составы семян растений чернушки посевной при культивировании в Центральном ботаническом саду и его изменения под воздействием АЛК и ЭМИ, а также компонентный состав масла контрольных и опытных растений. Согласно полученным спектральным данным (см. рисунок), основную часть масла *N. sativa* составляют триацилглицериды. Кроме того, в значительных количествах присутствуют парацимол и тимохинон, спектры поглощения которых подробно описаны в работе [7]. В составе масла исследованных образцов содержатся линолевая, олеиновая, эйкозодиеновая кислоты, насыщенные кислоты, а также тимохинон и парацимол. Выявлено, что предпосевная обработка приводит к изменению в количественном составе ЖК и тимохинона. Так, под влиянием обработок АЛК во всех концентрациях отмечено увеличение количества ЖК, лучший эффект наблюдался при обработке АЛК 10^{-11} % (содержание линолевой кислоты увеличивается на 15 %, олеиновой – на 29, эйкозодиеновой – на 39 %). Воздействие ЭМИ приводит к перераспределению в количестве ЖК в сторону их увеличения в процентном отношении к общему количеству ЖК в контроле (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Содержание компонентов в хлороформных экстрактах семян *Nigella sativa* L., %

Соединение	Контроль	АЛК 1	АЛК 2	АЛК 3	АЛК 4	Эпин 1	Режим 1	Режим 2	Режим 3
Линолевая кислота	55,4	55,1	55,7	58,1	63,9	58,4	63,4	60,4	64
Олеиновая кислота	13,6	16,9	13,8	15,3	17,6	16	13,7	11,1	14,5
Эйкозодиеновая кислота	3,8	3,9	3,6	3,3	5,3	3,2	3,5	2,9	3,5
Насыщенные ЖК	21,4	16,1	21,7	17,7	9,7	18,2	16,4	22,6	14,9
Парацимол	2,3	3,5	1,6	1,8	0,1	0,8	0,1	0,1	0,1
Тимохинон	0,6	1,2	0,4	0,9	0,3	0,6	–	–	–

П р и м е ч а н и е. В табл. 1, 2 приведены средние значения по выборкам, величина среднего не превышала 5 %.

По данным многочисленных работ, тимохинон обладает рядом положительных свойств – противовоспалительным, противосудорожным, антиоксидантным, противомикробным и др. Тимохинон способен также ингибировать синтез гистаминов и рост раковых клеток [9], поэтому повышение его содержания является важным показателем. Проведенные нами исследования показали, что данный эффект отмечен при обработке АЛК 1 (содержание тимохинона увеличивается практически в 2 раза по отношению к контролю), в то время как воздействие ЭМИ приводит к расходованию тимохинона в процессе роста растения, в результате чего накопления тимохинона в семенах не происходит.

На основании ЯМР-спектров ^{13}C проведена оценка относительного содержания ненасыщенных ЖК, а также их распределение в триацилглицеридах. Так, углероды при двойной связи ЖК имеют следующие химические сдвиги: для олеиновой кислоты δ составляет 130,36; 130,39; 130,69; 130,71 м. д., для линолевой – 128,57; 128,58; 128,75; 128,77; 130,67; 130,69; 130,91 м. д. Все сигналы являются дублетами (кроме последнего) и имеют различные химические сдвиги, обусловленные местом присоединения кислотных остатков к концевым или центральной гидроксильным группам глицерина. Сравнение интегральных линий в этих дублетах позволяет оценить положение кислотных остатков в молекуле триглицерида (табл. 2). Если таковое отсутствует, соотношение составляет 2:1.

Т а б л и ц а 2. Соотношение ненасыщенных жирных кислот, присоединенных к боковым гидроксильным группам глицерина, и идентичных кислот, присоединенных к центральной гидроксильной группе глицерина, в масле семян *Nigella sativa* L.

Соединение	Контроль	АЛК 1	АЛК 2	АЛК 3	АЛК 4	Режим 1	Режим 2	Режим 3
Линолевая кислота	1,46	1,41	1,37	1,54	1,49	1,27	1,49	1,64
Олеиновая кислота	1,27	1,14	1,42	1,56	1,16	1,24	1,39	1,35

Приведенные в табл. 2 данные показывают, что обе ненасыщенные кислоты в большинстве случаев находятся в центральном положении глицерина (особенно олеиновая), а насыщенные кислоты присоединяются преимущественно к боковым гидроксильным группам, т. е. находятся в положении 1 и 3.

Заключение. Таким образом, влияние ЭМИ и АЛК на ростовые процессы *N. sativa* наиболее выражено в начале вегетационного периода. ЯМР-анализ хлороформных экстрактов семян чернушки позволил выявить отличия в их жирнокислотном составе и строении триацилглицеридов под влиянием предпосевной обработки ЭМИ и АЛК. Установлено наличие в семенах *N. sativa* парацимола и тимохинона и их количественные изменения при обработке АЛК и ЭМИ. Показано снижение количества парацимола и тимохинона в семенах *N. sativa* под воздействием ЭМИ.

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № Б14М-073.

Автор выражает благодарность заведующему лабораторией физико-химических методов исследования ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси» канд. хим. наук Е. Д. Скаковскому за помощь в проведении ЯМР-анализа экстрактов семян чернушки, канд. физ.-мат. наук В. Н. Родионовой и другим сотрудникам лаборатории радиофизических исследований НИИ Ядерных проблем БГУ за помощь в проведении физических обработок семян, а также научным руководителям канд. биол. наук, доценту А. Г. Шутовой и канд. биол. наук, доценту Ж. Э. Мазец за помощь в планировании и проведении исследований.

Список использованной литературы

1. Нурмагомедова, П. М. Свойства чернушки посевной (*Nigella sativa*) / П. М. Нурмагомедова, М. Г. Омариева // Медицина и здравоохранение: материалы II междунар. науч. конф. – Уфа, 2014. – С. 62–65.
2. Belete, Y. HPTLC assay of thymoquinone in black seed and black seed oil (*Nigella sativa* L.) and identification of thymoquinone conversion with UV-VIS / Y. Belete, E. Dagne // J. of Drug Delivery & Therapeutics. – 2014. – N 4 (4). – P. 5–9.
3. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапиролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 413 с.
4. Петров, И. Ю. Стимуляция процессов жизнедеятельности в растениях микроволновым излучением / И. Ю. Петров, Э. В. Морозова, Т. В. Моисеева // Миллиметровые волны нетепловой интенсивности в медицине и биологии: сб. докл. – М.: ИРЭ АН СССР, 1991. – Т. 2. – С. 502–504.
5. Галь, Л. Н. Физические принципы функционирования материи живого организма / Л. Н. Галь. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2014. – 400 с.
6. Шиш, С. Н. Особенности влияния эпина и 5-аминолевулиновой кислоты на ростовые процессы *Calendula officinalis* L. / С. Н. Шиш, А. Г. Шутова, Ж. Э. Мазец // Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем: тр. Белорус. гос. ун-та. – 2013. – Т. 8. – Ч. 2. – С. 125–129.
7. Анализ хлороформных экстрактов семян чернушки / Е. Д. Скаковский [и др.] // Тр. БГТУ. Сер. Химия, технология органических веществ и битехнология. – 2015. – № 4 (177). – С. 234–239.
8. Шиш, С. Н. Особенности реакции антиоксидантной системы растений *Calendula officinalis* L. и *Nigella sativa* L. на химические и физические воздействия / С. Н. Шиш, А. Г. Шутова, Ж. Э. Мазец // Образование и наука в Беларуси. – Минск: БГПУ, 2014. – С. 322–326.
9. Рудь, Н. К. Основные результаты фитохимического и фармакологического исследования чернушки посевной / Н. К. Рудь, А. М. Сампиев, Н. А. Давитаян // Науч. ведомости. Сер. Медицина. Фармация. – 2013. – № 25 (168). – Вып. 24. – С. 207–212.

Поступила в редакцию 22.03.2016

УДК 579.66; 602.6

А. А. АРАШКОВА¹, И. А. ГОНЧАРОВА¹, А. Г. МИЦКЕВИЧ², А. А. КОСТЕНЕВИЧ¹, Т. В. ШАРИЧ¹

ГРИБЫ РОДА *ASPERGILLUS* В ОЧАГАХ ПЛЕСНЕВОГО ПОРАЖЕНИЯ ЖИЛЫХ И ОБЩЕСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: missalina17@rambler.ru

²Национальный художественный музей Беларуси, Минск, Беларусь

В результате микологического анализа проб, отобранных в 2011–2015 гг. из жилых и общественных помещений, установлено, что при временном локальном повышении влажности материалов в помещениях со слабым воздухообменом чаще всего встречаются представители рода *Aspergillus*. К основным видам, встречающимся на различных строительных материалах, относятся *A. flavus*, *A. versicolor* и *A. niger*. Виды, выявленные на музейных предметах и архивных документах, обладают выраженными ксеротолерантными свойствами.

Ключевые слова: плесневые грибы, *Aspergillus*, ксеротолерантность.

A. ARASHKOVA¹, I. GONTCHAROVA¹, A. MITSKEVICH², A. KASTSIANEVICH¹, T. SHARYCH¹

FUNGI OF THE GENUS *ASPERGILLUS* IN MOULD DAMAGED DWELLINGS AND PUBLIC BUILDINGS

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: missalina17@rambler.ru

²The National Art Museum of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

Mycological analysis of samples taken in 2011–2015 from indoor environments found that in case of temporary local increase of material moisture in buildings with poor air exchange the highest frequency of occurrence belongs to fungi of the genus *Aspergillus*. *A. flavus*, *A. versicolor* and *A. niger* occur in different building materials more often than other species. The species isolated from museum objects and archival documents possess xerotolerant properties.

Keywords: mould fungi, *Aspergillus*, xerotolerance.

Введение. Важной составляющей экологической безопасности жилой среды человека является микологическое состояние помещений. Негативное влияние на здоровье людей могут оказывать микроскопические (плесневые) грибы, которые активно развиваются в широком температурном диапазоне в условиях повышенной влажности практически на всех строительных материалах, включая кирпич, бетон, штукатурку, дерево, пластик, резину, тканевую основу линолеума, окрашенные поверхности, обои и т. д. [1]. Среди условно-патогенных грибов особая роль принадлежит грибам рода *Aspergillus*, наиболее часто провоцирующим заболевания, имеющие микотическую природу [2].

Цель данного исследования – определение частоты и характера встречаемости грибов рода *Aspergillus* при микологических обследованиях жилых и общественных помещений.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили микроскопические мицелиальные грибы, выделенные из проб, взятых при обследовании помещений, колонизированных плесневыми грибами.

Для определения степени микробной обсемененности материалов и выявления очагов плесневого поражения взятие проб с поверхности материалов осуществляли стерильными ватными палочками с последующим перенесением грибных колониеобразующих единиц (КОЕ) на питательную среду в чашках Петри четырьмя диаметрными штрихами. О наличии очага плесневого поражения свидетельствует появление по штрихам четких полос, образованных множеством мелких колоний. Основным агентом биоповреждения считается формирующий штрихи доминирующий вид с одинаковыми культуральными признаками. Свободное пространство между штрихами, дающее возможность разрастаться колониям подстилающих культур, и анализ

культуральной однородности реверзума позволяют выявить кодоминирующие виды с достаточно высоким обилием КОЕ. Культуры грибов, представленные единичными колониями, относятся к сопутствующей микобиоте.

Частоту встречаемости родов рассчитывали как отношение количества проб, в которых встречались представители данного рода, к общему количеству проб. Для количественной характеристики представленности отдельных видов определяли относительное обилие – отношение числа изолятов данного вида к общему числу изолятов [1].

Для оценки ацидофицирующей способности микромицетов использовали среду Чапека с 5 % глюкозы и 0,5 % карбоната кальция. Показателем кислотообразования служила зона просветления мелового агара вокруг колонии [3].

Моделирование условий пониженной активности воды ($a_w = 0,85$) проводили путем добавления в среду Чапека 17 %-ного хлорида натрия [4].

Результаты и их обсуждение. По результатам микологических обследований жилых и общественных помещений в 2011–2015 гг. установлено, что росту грибов рода *Aspergillus* способствует, как правило, локальное увлажнение материала или наличие на его поверхности конденсационной влаги, появляющейся в помещениях с застойными зонами воздуха при частом перепаде температур.

Микологический анализ более 4,2 тыс. проб показал, что грибы рода *Aspergillus* характеризуются наибольшей частотой встречаемости (95 %) в очагах плесневого поражения помещений с нарушенным воздухообменом из-за отсутствия вентиляции или неграмотного проветривания. Так, например, недостаточное вентилирование в детских комнатах приводит к наличию застойных зон воздуха (рис. 1).

Оценка характера встречаемости грибов рода *Aspergillus* в пробах показала, что представители данного рода относятся к составу как доминирующей (в том числе кодоминирующей), так и сопутствующей микобиоты, что является важной характеристикой для диагностики очага плесневого поражения. Так, например, когда стены недолго сохраняют высокую влажность после заливания, грибы рода *Aspergillus* в больших количествах присутствуют среди изолятов, частота их встречаемости как доминирующих культур составляет 58 %. При сильном намокании бетонных стен в результате протечек или заливаний в 70 % случаев очаги плесневого поражения формируют грибы рода *Stachybotrys*, а отдельные виды рода *Aspergillus* могут присутствовать лишь в качестве сопутствующих колонизаторов (рис. 1).

При нарушении гидроизоляции и постоянном увлажнении конструкционных материалов за счет капиллярных сил представители рода *Aspergillus* встречаются относительно редко (24 %).

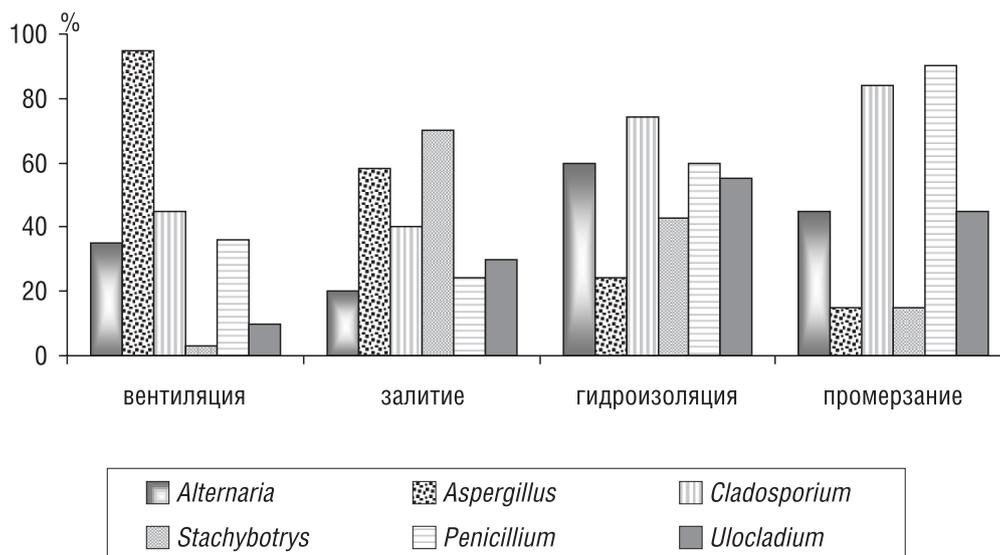


Рис. 1. Частота встречаемости родов микромицетов в очагах плесневого поражения, вызванных различными причинами

К таким агентам биоповреждения относятся наиболее опасные для здоровья виды *A. fumigatus* и *A. niger* (рис. 1).

В пробах из очагов биоповреждения материалов и конструкций, длительное время находящихся в условиях низких температур на строительных объектах, в неотапливаемых подвальных помещениях грибы рода *Aspergillus* присутствуют в качестве кодоминирующей и сопутствующей микобиоты. В таких случаях наиболее часто встречается *A. niger*, в основном как сопутствующий вид, реже – *A. versicolor*, обычно как кодоминант (рис. 1).

Наиболее широкое видовое разнообразие рода *Aspergillus* отмечается в очагах биоповреждения обоев. Состав культур, выделенных из пораженных симплексных, дуплексных, виниловых и флизелиновых обоев, представлен 12 видами. Число видов, встречающихся на поверхности красочного и штукатурного покрытия, более ограничено и составляет 10 и 8 соответственно. Наиболее низким обилием видов характеризуются очаги плесневого поражения гипсокартонных плит. К видам, выделяемым с наибольшей частотой на различных строительных материалах, относятся *A. flavus*, *A. niger* и *A. versicolor* (см. таблицу).

Встречаемость видов рода *Aspergillus* в очагах биоповреждения строительных материалов

Вид	Обилие видов, %			
	Обои	Красочное покрытие	Штукатурка	Гипсокартон
<i>A. calidoustus</i>	1,9	3,0	0,9	–
<i>A. candidus</i>	0,9	–	–	–
<i>A. clavatus</i>	0,6	1,1	–	–
<i>A. flavus</i>	13,4	11,3	18,3	26,0
<i>A. fumigatus</i>	4,7	7,2	6,6	–
<i>A. niger</i>	41,4	25,7	30,0	44,6
<i>A. ochraceus</i>	3,8	8,3	1,4	8,9
<i>A. puniceus</i>	4,5	3,4	–	–
<i>A. versicolor</i>	25,2	32,1	31,0	20,5
<i>A. terreus</i>	1,3	6,0	11,0	–
<i>A. ustus</i>	1,7	1,9	0,9	–
<i>A. wentii</i>	0,6	–	–	–

Следует отметить, что вид *A. niger* обладает способностью колонизировать такие труднодоступные субстраты, как минераловолокнистые потолочные плиты, стекловолоконные гидроизоляционные холсты, минераловатные и асбестосодержащие теплоизоляционные материалы, к заявленным эксплуатационным свойствам которых относится устойчивость к поражению микроорганизмами. Развитие *A. niger* на материалах из минерального сырья зачастую характеризуется интенсивной споруляцией и продукцией пигментов. Отмечаются также случаи поражения грибом *A. niger* минерального заполнителя межплиточных швов с полимерными добавками в ванных комнатах и даже в чаше бассейнов.

Штаммы *A. niger*, выделенные из материалов на минеральной основе, характеризовались высокой ацидофицирующей способностью. На 7-е сутки культивирования ширина зоны просветления мелового агара вокруг колоний у разных штаммов *A. niger* достигала 20–80 % от радиуса колоний, что свидетельствует о растворении карбоната кальция за счет выделения грибами органических кислот.

Установлено, что *A. versicolor*, в отличие от *A. niger*, редко выявляется при биоповреждениях материалов с высокой влажностью. *A. versicolor* часто колонизирует осыпающуюся штукатурку в местах старых протечек в плохо проветриваемых неотапливаемых помещениях (подвалах, фондохранилищах, архивах). При перепаде температуры в музейных помещениях с затрудненной циркуляцией воздуха грибы *A. versicolor* и *A. ochraceus* являются характерными деструкторами текстильных материалов, а к основным контаминантам произведений музейной живописи относятся *A. versicolor* и *A. niger*. При выпадении конденсационной влаги плесневой колонизации подвержены также керамические изделия. К выделенным из музейной керамики видам рода *Aspergillus* относятся *A. candidus*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ustus* и *A. versicolor*.

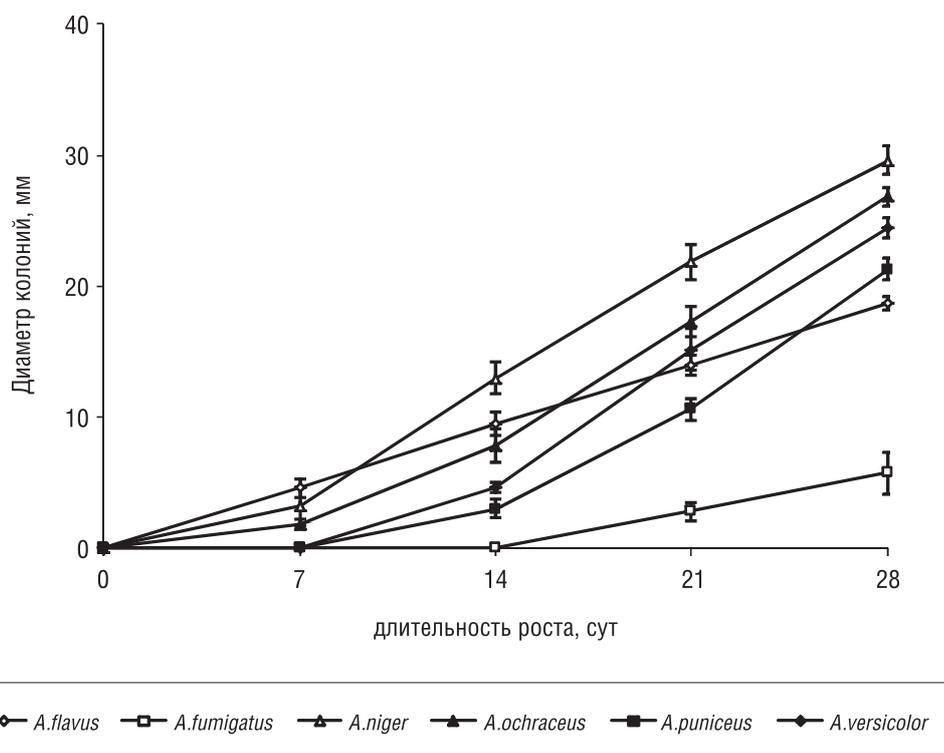


Рис. 2. Влияние низкой активности воды субстрата ($a_w = 0,85$) на развитие грибов рода *Aspergillus*, выделенных из очагов плесневого поражения материалов в музейных фондохранилищах и архивах

Следует отметить, что аспергиллы, колонизировавшие строительные материалы самих музейных и архивных помещений и предметы хранения, обладали выраженными ксеротолерантными свойствами. Так, гриб *A. fumigatus*, обычно поражающий материалы при аварийных протечках, подтоплении фундаментов и нарушении гидроизоляции зданий [5], в данных исследованиях проявил способность к росту на среде с низкой активностью воды ($a_w = 0,85$). Радиальная скорость роста *A. versicolor* составила 0,8 и 1,3 мм/сут соответственно при $a_w = 0,85$ и $a_w = 0,99$, у *A. niger* эта разница была более значительной – 0,9 и 3,9 (рис. 2).

Заключение. Представители рода *Aspergillus* обладают наибольшей частотой встречаемости (95 %) на поверхности материалов при временном локальном повышении влажности материалов в относительно сухих и теплых помещениях со слабым воздухообменом. Такие условия характерны, как правило, для детских комнат, где недостаточное вентилирование приводит к наличию застойных зон воздуха, а также для музейных хранилищ и архивов. Изучение влияния низкой активности воды субстрата ($a_w = 0,85$) на развитие грибов рода *Aspergillus* показало, что виды, выделенные из музейных предметов и архивных документов, обладают выраженными ксеротолерантными свойствами. Строительные материалы наиболее часто поражаются видами *A. flavus* (11–26 %), *A. versicolor* (21–32 %) и *A. niger* (26–45 %).

Список использованной литературы

1. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях: их потенциальная опасность для здоровья людей / Е. В. Доршакова [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 53–58.
2. Марфенина, О. Е. Экологические условия развития потенциально патогенных мицелиальных грибов / О. Е. Марфенина // Успехи мед. микологии. – 2005. – Т. 5. – С. 74–77.
3. Влияние карбоната кальция на ацидофицирующую активность микромицетов / К. В. Сазанова [и др.] // Вестн. СПбГУ. – Сер. 3. – 2010. – Вып. 3. – С. 93–98.
4. Ребрикова, Н. Л. Экстремально ксерофильные грибы, обнаруженные в музейных фондах / Н. Л. Ребрикова, В. Б. Понизовская // Совр. микология в России. – 2015. – Т. 4. – С. 298–300.
5. Вклад микробиоты в процессы старения больничных зданий и ее потенциальная опасность для здоровья больных / Н. А. Беляков [и др.] // Проблемы мед. микологии. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 3–12.

Поступила в редакцию 22.03.2016

УДК 578.52

П. В. КУЗМИЦКАЯ, О. Ю. УРБАНОВИЧ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВИРУСА МОЗАИКИ ЯБЛОНИ В САДАХ БЕЛАРУСИ

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: P.Kuzmitskaya@igc.by, O.Urbanovich@igc.by*

С помощью метода ОТ-ПЦР обнаружено, что среди деревьев из действующих промышленных и маточно-черенковых садов 1,5 % заражены вирусом мозаики яблони. У деревьев старше 50 лет инфекция не выявлена.

Степень идентичности вирусов мозаики яблони, распространенных на территории Беларуси, определенная с помощью сиквенирования фрагментов гена, кодирующего белок оболочки, колебалась в пределах от 98,9 до 99,6 %. Анализ эволюционных взаимоотношений полученных нами нуклеотидных последовательностей и их гомологов из базы данных GenBank показал, что сходство между генотипами вируса наблюдается как у изолятов, выделенных из разных растений, растущих в одном географическом регионе, так и у изолятов, выделенных из одного вида растений, растущих в различных географических регионах. Это может быть следствием двух способов распространения вируса мозаики яблони – вегетативного и механического.

Ключевые слова: вирус мозаики яблони; ApMV; яблоня; ОТ-ПЦР; филогенетический анализ; ген, кодирующий белок оболочки.

P. V. KUZMITSKAYA, O. Yu. URBANOVICH

GENETIC POLYMORPHISM AND APPLE MOSAIC VIRUS PREVALANCE IN THE GARDENS OF BELARUS

*Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: P.Kuzmitskaya@igc.by, O.Urbanovich@igc.by*

Apple trees of different cultivars growing in Belarus were tested using RT-PCR for Apple mosaic virus, an important economically and common pathogens in commercial orchards. Viral infected apple trees (1.5 %) were detected in the modern horticultural plantations and were not found among the old trees aged more than 50 years.

The fragments of ApMV coat protein gene were cloned and sequenced. The analysis of their nucleotide sequences showed that the identity between them ranged from 98.9 to 99.6 %. The analysis of evolutionary relationships of nucleotide sequences obtained in this study and their homologs from the GenBank database revealed that the similarity between the viral genotypes was observed both between the isolates from various plants growing in the same geographical region, as well as between the isolates obtained from the same plant species, growing in different geographic regions. This picture was probably formed as a result of two methods of apple mosaic virus propagation: vegetative and mechanical.

Keywords: Apple mosaic virus, ApMV, apple, RT-PCR, phylogenetic analysis, coat protein gene.

Введение. Вирус мозаики яблони (ApMV – Apple mosaic virus) принадлежит к роду *Ilarvirus* сем. *Bromoviridae*. Геном вируса является сегментированным и состоит из четырех плюс-смысловых РНК. РНК 1 и РНК 2 составляют одну большую открытую рамку считывания, которая содержит домены, кодирующие метилтрансферазу-1, хеликазу и РНК-зависимую РНК-полимеразу. РНК 3 является бицистронной и кодирует белок вирусного капсида и двигательный белок. РНК 4 кодирует белок вирусной оболочки и необходима для нормального функционирования вируса [1, 2].

ApMV инфицирует множество видов культурных растений – яблоню, миндаль, абрикос, фундук, малину, красную смородину, розу, клубнику, черешню, сливу, нектарин, хмель и др. [3, 4]. Кроме того, он обнаружен у некоторых лишайников – *Usnea hirta*, *Pseudevernia furfuracea*, *Xanthoria parietina*, *Lasallia pustulata*, *Usnea Antarctica*, *Usnea chaetophora*, которые, возможно, являются естественным природным резервуаром для вируса мозаики яблони [5].

У восприимчивых культур симптомы заражения проявляются в виде желтоватого обрамления жилок или светлых пятен. На листьях появляются бледные или ярко-желтые размытые области, при этом мозаичные области могут быть нерегулярными или представлять собой полосы вдоль главных жилок. С течением времени заболевание прогрессирует, и пятна становятся ярко-желтыми или белыми. На листьях образуются некротические области, снижается общая фотосинтетическая активность. Листья, выросшие летом при высоких среднесуточных температурах, обычно не имеют симптомов мозаики. На плодах заболевание не диагностируется [6]. У зараженных яблонь отмечается замедление роста побегов, снижение количества и массы плодов, а также содержания в них аскорбиновой кислоты [7]. Урожайность растений снижается на 30–50 %. Больные деревья характеризуются снижением роста на 50 % и уменьшением диаметра ствола на 20 %. Восприимчивость к заболеванию зависит от сортовой принадлежности яблони. Сорта Голден Делишес и Джонатан считаются наименее устойчивыми [8]. Проведенное в США исследование, оценивающее экономическое значение программы защиты от вирусов, показало, что только вирус мозаики яблони может быть причиной потери до 46 % урожая у яблонь сорта Голден Делишес и до 42 % у сорта Ред Делишес [9, 10]. Показано, что основные пути передачи вируса – вегетативное размножение растений и механическая инокуляция [11, 12]. Поэтому при размножении сортов яблони рекомендуется использовать свободные от вирусов маточные деревья [13].

На сегодняшний день известно несколько методов тестирования садовых насаждений для выявления инфицированных растений. Наиболее точным и быстрым из них является метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [14].

Цель данного исследования – изучение с помощью метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией распространенности вируса мозаики яблони в отдельных садовых насаждениях Беларуси, а также сиквенирование фрагментов генома вируса для анализа его генетической связи с вирусами, распространенными в других странах.

Материалы и методы исследования. Отбор растительного материала для анализа проводили весной и летом 2014 г. на территории Минской, Брестской, Гродненской областей и г. Минска. Образцы яблони отбирали в старых и современных садовых насаждениях.

В группу старых насаждений вошли деревья, имеющие возраст не менее 50 лет. Из них 29 росли на территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси, остальные 97 – в г. Минске и Минском районе в бывших приусадебных и промышленных хозяйствах. В настоящее время они не имеют экономической ценности, растут в естественных условиях и уход за ними со стороны человека не производится.

В группу современных насаждений яблони входили деревья из действующих маточно-черенковых и промышленных садов. Отбор растений проводили в четырех хозяйствах, расположенных на территории Минской, Гродненской и Брестской областей Беларуси.

Визуально все протестированные растения, 126 старых и 130 современных индивидуальных деревьев яблони, были здоровы. В качестве положительных контролей при проведении ОТ-ПЦР использовали образцы листьев двух яблонь, зараженных вирусом мозаики яблони. Препараты РНК получали из фрагментов листовых пластин или почек, отобранных у отдельных растений. Выделение РНК проводили с помощью набора GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) по методике производителя. Для синтеза первой нити кДНК использовали набор RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) согласно рекомендованному протоколу. Для идентификации вируса AMV применяли метод, описанный Hassan и соавт. [15]. В качестве внутреннего контроля в реакции использовали амплификацию с помощью праймеров к созревшей мРНК гена, кодирующего субъединицу 5-НАДН-дегидрогеназы. Такой контроль позволяет избежать ложноотрицательных результатов, связанных с деградацией РНК или с присутствием ингибиторов обратной транскриптазы [16]. В качестве отрицательного контроля матрицу кДНК в реакции заменяли равным количеством деионизированной воды. Внешним положительным контролем являлась РНК, выделенная из образца растительной ткани растений, зараженных вирусом ArMV.

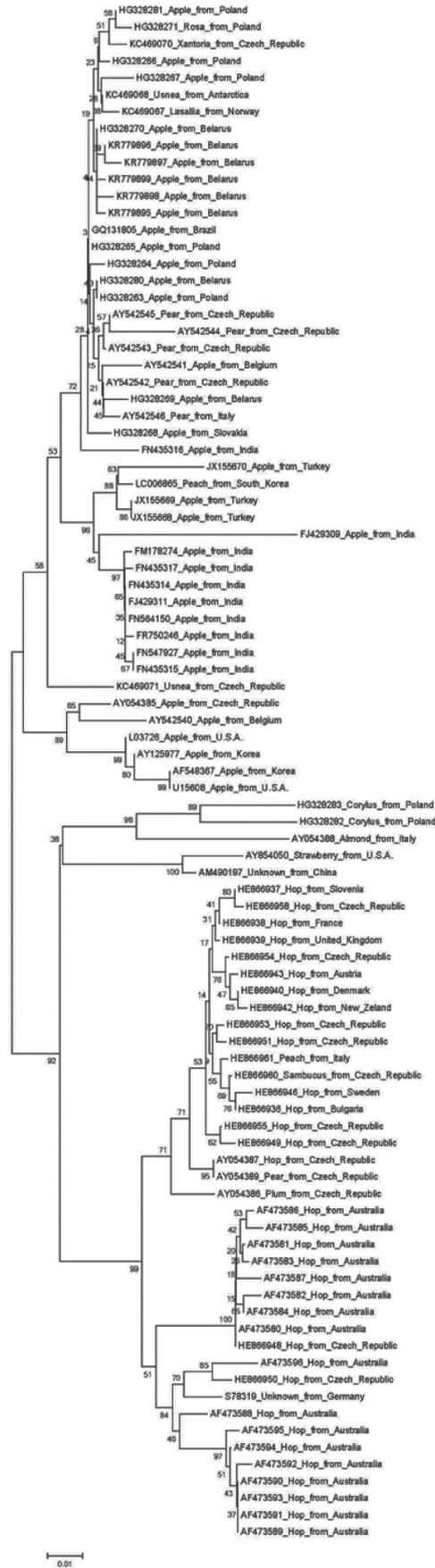
Продукты амплификации разделяли в 1 %-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиум бромидом. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific).

Продукты амплификации после электрофоретического разделения вырезали из агарозного геля для последующего выделения фрагментов ДНК с помощью набора GeneJet™ Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Выделенные ампликоны лигировали в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали штамм *E. coli* DH5 α , с помощью InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя. После выращивания на LB-Amp среде из трансформантов выделяли плазмидную ДНК, используя Plasmid GeneJet™ Miniprep Kit (Thermo Scientific), согласно протоколу производителя. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, сиквенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) и M13 R (CAGGAAACAGCTATGAC). Для проведения реакции использовали BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Амплификацию для сиквенирования и очистку полученных продуктов проводили в соответствии с методикой производителя. Продукты амплификации разделяли на сиквенаторе GeneticAnalyzer 3500 (Applied Biosystems). Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности выполняли с помощью программного обеспечения, представленного на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), и программы Geneious 7.1. Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей вируса использовали алгоритм CLUSTALW [17]. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MegaB [18]. Филогенетические деревья построены методом Neighbor-Joining [19] с 1000 бутстреп репликаций.

Результаты и их обсуждение. Для выявления зараженных вирусом мозаики яблони деревьев обследовано 130 индивидуальных яблонь из современных садовых насаждений, принадлежащих к 60 сортам вида *Malus* \times *domestica*. Все протестированные растения не имели признаков заражения вирусными инфекциями. С помощью мультиплексной ОТ-ПЦР среди них было выявлено две яблони сортов Коваленковское и Синап орловский, зараженные ApMV (1,5 % от общего количества деревьев). Инфицированные яблони обнаружены в Минской и Брестской областях. Причем среди растений одного сорта выявлены как инфицированные, так и свободные от вирус-растения.

Для оценки распространенности вирусных инфекций среди старинных насаждений протестировано в общей сложности 126 индивидуальных деревьев яблони, относящихся по меньшей мере к 5 видам (*Malus* \times *domestica*, *Malus baccata*, *Malus prunifolia*, *Malus sachalinensis*, *Malus purpureae*). В результате тестирования методом ОТ-ПЦР старинных деревьев, инфицированных вирусом мозаики яблони, не выявлено. Сравнение полученных нами результатов с итогами мониторинга зараженности вирусными инфекциями садовых насаждений Беларуси, проведенным в период с 1998 по 2009 г. сотрудниками РУП «Институт плодоводства» под руководством д-ра с/х наук Н. В. Кухарчик с помощью метода ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), свидетельствует о том, что доля зараженных вирусом мозаики яблони деревьев была ниже в тестируемой выборке – ранее вирус был обнаружен в среднем у 3,5 % яблонь [6]. Наблюдаемые различия могут быть связаны как с неоднородностью встречаемости вируса среди различных насаждений, так и с успешной реализацией профилактических мер по предотвращению распространения вирус-яблони в Беларуси.

Фрагменты геномов вируса мозаики яблони, включая ампликоны из двух яблонь, использовавшихся в качестве положительных контролей, были клонированы и сиквенированы. Всего было сиквенировано 5 фрагментов различных геномов вирусов, выделенных из 4 зараженных деревьев (см. таблицу). Длина полученных нуклеотидных последовательностей составила 450–451 нуклеотид. Степень их идентичности колебалась в пределах от 98,9 до 99,6 %. Различия между последовательностями были обусловлены однонуклеотидными заменами, в одном случае – однонуклеотидной инсерцией. Дивергенцию последовательностей можно объяснить ошибками репликации, возникающими в большом количестве ввиду того, что у РНК-зависимой РНК-полимеразы, амплифицирующей геном вируса, отсутствует корректирующая активность [20, 21]. Сравнение с референсной последовательностью РНК 3 вируса ApMV NC_003480.1 показало, что



Дендрограмма генетического сходства нуклеотидных последовательностей вируса мозаики яблони

сиквенированные фрагменты соответствуют 166–616-му нуклеотидам гена, кодирующего белок оболочки вируса. При компьютерной трансляции нуклеотидной последовательности в аминокислотную у всех сиквенированных образцов обнаружен стоп-кодон, возникший в результате сдвига рамки считывания. Причиной этого является делеция, произошедшая в позиции, соответствующей 229-му нуклеотиду гена референсной последовательности. По всей видимости, сиквенированные нами фрагменты белка оболочки являются нефункциональными. Анализ гомологов из базы данных GenBank показал, что нуклеотидные последовательности вируса мозаики яблони с делециями в этом положении имеются у ряда растений различных географических широт – от Антарктики до Индии. Однако большинство из опубликованных в GenBank последовательностей изолятов выделено из растений северной и центральной Европы (Антарктика, Норвегия, Латвия, Беларусь, Польша, Чехия). Вопрос о том, возникала ли эта мутация неоднократно в разных растениях, либо мутантные копии РНК вируса мозаики яблони получены из одного общего источника, остается открытым. В пользу первого предположения свидетельствует тот факт, что последовательности с делецией в 229-й позиции гена, кодирующего белок оболочки вируса, не утратили сходства с функциональными кодирующими генами вируса. Следовательно, эта мутация возникла сравнительно недавно.

Результат тестирования методом ОТ-ПЦР яблонь разных сортов на их зараженность вирусом бороздчатости древесины яблони

Название изолята	Сорт яблони, из которого выделен вирус	Место произрастания растения-хозяина	Номер доступа в GenBank
ApMV_SMX_SinOrl	Синап орловский	Минская область	KR779895
ApMV_SMX_Koval-2	Коваленковское	Минская область	KR779896
ApMV_SMX_Koval-1	Коваленковское	Минская область	KR779897
ApMV_HPr_Sh2/6-2	Шампион	Брестская область	KR779898
ApMV_HPr_Sh1/5-1	Шампион	Брестская область	KR779899

Модель эволюционных отношений, построенная для последовательностей фрагментов белка оболочки вируса мозаики яблони, выделенных на территории Беларуси, и их гомологов из базы данных GenBank, позволила оценить степень генетического родства между изолятами. На филогенетическом древе, представленном на рисунке, изоляты вируса мозаики яблони, выделенные в Беларуси из деревьев яблони, находятся в одном кластере с изолятами из польских, чешских, бразильских, бельгийских, словацких, индийских яблонь, изолятами из розы, растущей в Польше, изолятами, выделенными из трех видов лишайников, найденных в Чехии, Норвегии и Антарктике, изолятами из деревьев груши, произрастающих в Чехии и Италии. Таким образом, большинство изолятов вируса мозаики яблони из этой группы выделено из представителей сем. Розоцветные и лишайников, произрастающих в Европе. К другому наиболее крупному кластеру принадлежат изоляты вируса, выделенные из хмеля в Австралии, Чехии, Болгарии, Швеции, Словении, Франции, Великобритании, Австрии, Германии и Новой Зеландии. Также в этот кластер входят изоляты, выделенные из сливы и груши, растущих в Чехии, изолят, полученный из персика в Италии, а также некоторые другие изоляты. Таким образом, сходство между генотипами вируса наблюдается как у изолятов, выделенных из разных растений, растущих в одном географическом регионе, так и у изолятов, выделенных из одного вида растений, растущих в разных географических регионах. Это может быть следствием двух способов распространения вируса мозаики яблони – вегетативного и механического.

Заключение. С помощью метода ОТ-ПЦР установлено, что среди деревьев из действующих промышленных и маточно-черенковых садов 1,5 % заражены вирусом мозаики яблони. У деревьев старше 50 лет инфекция не выявлена.

Степень идентичности вируса мозаики яблони, определенная с помощью сиквенирования фрагментов гена, кодирующего белок оболочки, колебалась в пределах от 98,9 до 99,6 %. Анализ эволюционных взаимоотношений полученных в этом исследовании нуклеотидных последовательностей и их гомологов из базы данных GenBank показал, что сходство между генотипами

вируса наблюдается как у изолятов, выделенных из разных растений, растущих в одном географическом регионе, так и у изолятов, выделенных из одного вида растений, растущих в различных географических регионах. Это может быть следствием двух способов распространения вируса мозаики яблони – вегетативного и механического.

Список использованных источников

1. Bereger, P. The complete nucleotide sequence of apple mosaic virus (ApMV) RNA 1 and RNA 2: ApMV is more closely related to alfalfa mosaic virus than to other ilarviruses / P. Bereger, P. Shiel // *J. of Gen. Virol.* – 2000. – Vol. 81. – P. 273–278.
2. Sanchez-Navarro, J. Nucleotide sequence of apple mosaic ilarvirus RNA 4 / J. Sanchez-Navarro, V. Pallas // *J. of Gen. Virol.* – 1994. – Vol. 75. – P. 1441–1445.
3. Petrzik, K. Remarkable variability of apple mosaic virus capsid protein gene after nucleotide position 141 / K. Petrzik, O. Lenz // *Arch. of Virol.* – 2002. – Vol. 147, N 7. – P. 1275–1285.
4. Molecular characterization of the Indian strain of Apple mosaic virus isolated from apple (*Malus domestica*) / T. Thochom [et al.] // *Phytoparasitica.* – 2009. – Vol. 37, N 4. – P. 375–379.
5. Lichens – a new source or yet unknown host of herbaceous plant viruses? / K. Petrzik [et al.] // *Eur. J. of Plant Pathol.* – 2014. – Vol. 138, N 3. – P. 549–559.
6. Кухарчик, Н. В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н. В. Кухарчик. – Минск: Беларус. навука, 2012. – 209 с.
7. Effect of apple mosaic virus on the growth, yield and quality of apple / B. B. Singh [et al.] // *Punjab Hortic J.* – 1979. – Vol. 19. – P. 80–82.
8. Susic, D. Virus diseases of fruit trees / D. Susic, R. Ford, M. Tosic // *Handbook of plant virus diseases.* – 1999. – P. 321–432.
9. Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US / T. Cembali [et al.] // *Crop Protection.* – 2003. – Vol. 22, N 10. – P. 1149–1156.
10. Zawadzka, B. The effect of mosaic and rubbery wood infection on the growth and yield of apple trees / B. Zawadzka // *Zesz. Probl. Postepow Nauk Roln.* – 1983. – Vol. 291. – P. 385–390.
11. Shiel, P. J. The complete nucleotide sequence of Apple mosaic virus (ApMV) RNA 1 and RNA 2: ApMV is more closely related to alfalfa mosaic virus than to other ilarviruses / P. J. Shiel, P. H. Berger // *J. of Gen. Virol.* – 2000. – Vol. 81. – P. 273–278.
12. Petrzik, K. Capsid protein sequence gene analysis of Apple mosaic virus infecting pears / K. Petrzik // *Eur. J. of Plant Pathol.* – 2005. – Vol. 111. – P. 355–360.
13. EPPO Standards – Certification schemes – PM 4/27(1) Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia* // *EPPO Bull.* – 1999. – Vol. 29, N 3. – P. 239–252.
14. Detection of four apple viruses by ELISA and RT-PCR assays in Turkey / K. Caglayan [et al.] // *Turk. J. Agric. For.* – 2006. – Vol. 30. – P. 241–246.
15. Hassan, M. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR / M. Hassan, A. Myrta, J. Polak // *J. of Virol. Meth.* – 2006. – Vol. 133. – P. 124–129.
16. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control / W. Menzel, W. Jelkmann, E. Maiss // *J. of Virol. Meth.* – 2002. – Vol. 99. – P. 81–92.
17. Thompson, J. D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // *Nucl. Acids Res.* – 1994. – Vol. 22, N 22. – P. 4673–4680.
18. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // *Mol. Biol. and Evolution.* – 2013. – Vol. 30, N 12. – P. 2725–2729.
19. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Mol. Biol. and Evolution.* – 1987. – Vol. 4, N 4. – P. 406–425.
20. Drake, J. W. Mutation rates among RNA viruses / J. W. Drake, J. J. Holland // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 13910–13913.
21. Roossinck, M. J. Mechanisms of plant virus evolution / M. J. Roossinck // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 1997. – Vol. 35. – P. 191–209.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 598.33.063.7:591.9

К. В. ГОМЕЛЬ, Е. Э. ХЕЙДОРОВА, М. Е. НИКИФОРОВ

**АНАЛИЗ ВНУТРИВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ КУЛИКА-СОРОКИ
НА ОСНОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ
И ПУТИ ЕГО РАССЕЛЕНИЯ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ**

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: ural-science@yandex.by

Анализ полиморфизма митохондриального гена *COI* показал, что на территории Беларуси присутствуют особи кулика-сороки с гаплотипами, характерными для зон обитания подвидов *H. o. ostralegus* и *H. o. longipes*. Это подтверждает ранее высказанное предположение о гнездовании на северо-западе Беларуси морской формы *H. o. ostralegus*.

Ключевые слова: кулик-сорока, подвиды, расселение, Беларусь.

K. HOMEL, E. KHEIDOROVA, M. NIKIFOROV

**ANALYSIS OF THE INTRASPECIFIC STRUCTURE OF EURASIAN OYSTERCATCHER ON THE BASIS
OF MOLECULAR DATA AND WAYS OF HIS DISTRIBUTION ON THE TERRITORY OF BELARUS**

Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: ural-science@yandex.by

On the basis of *COI* gen polymorphism analysis it can be concluded that on the territory of Belarus individuals of Eurasian oystercatcher with haplotypes from habitat area of *H. o. ostralegus* and *H. o. longipes* are present. The last confirms suggestion about nesting on the north-west of Belarus *H. o. ostralegus*.

Keywords: Eurasian Oystercatcher, subspecies, resettlement, Belarus.

Введение. Кулик-сорока на территории Беларуси является малочисленным гнездящимся, перелетным и транзитно мигрирующим видом. Он занесен в Красную книгу Республики Беларусь. Мировая популяция кулика-сороки сокращается (Wetlands International 2012). Международный статус описываемой популяции вида, согласно IUCN Red List (2015), соответствует категории NT (Near Threatened). Ареал обитания и статус пребывания кулика-сороки отражены на рис. 1.

На территории Беларуси можно выделить две разделенные популяции куликов-сорок. Птицы первой популяции гнездятся в поймах рек юга и юго-востока страны, птицы второй популяции, северной, более разобщенной, гнездятся на Браславских озерах и Вилейском водохранилище [1, 2]. Данные промеров, особенно длины клюва до границы оперения (основной диагностический признак при определении подвидов) свидетельствуют о том, что птицы, гнездящиеся в пойме Припяти, относятся к материковому подвиду *H. o. longipes*. Относительно гнездования данного подвида кулика-сороки на юге и юго-востоке страны разногласий нет [3, 4].

Согласно М. Е. Никифорову [3], анализ некоторых морфометрических показателей свидетельствует о наличии на севере страны птиц номинативного подвида *H. o. ostralegus*, на основании чего им была выдвинута гипотеза о том, что заселение территории страны происходит по двум направлениям: за счет расселения подвида *H. o. longipes* на северо-запад и номинативного подвида *H. o. ostralegus* – на юго-восток. Однако наличие особей номинативного подвида на северо-западе страны подверглось сомнению В. В. Гричицом [4], который считает, что как южная, так и северная части территории Беларуси заселены материковым подвидом (*H. o. longipes*).



Рис. 1. Ареал обитания кулика-сороки (согласно Birdlife International, 2015).

Серый цвет – вид гнездится, черный цвет – места зимовки.

Цель данной работы – уточнение подвидового статуса кулика-сороки на территории Беларуси с помощью молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы исследования. В качестве генетического маркера выбран митохондриальный ген первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*). Данный маркер хорошо зарекомендовал себя как надежный инструмент для ДНК-баркодинга, в том числе у птиц [5–7]. В анализ включено 6 проб ДНК, выделенных из тканей и крови кулика-сороки из Беларуси (4 пробы из окрестностей г. Турова, 2 – из района г. Браслава), а также 2 пробы ДНК из тканей кулика-сороки, взятые на территории России (г. Киров и остров Сахалин). В качестве сравнительного материала использовали нуклеотидные последовательности GenBank из России (Свердловская, Мурманская, Астраханская области), Швеции, Нидерландов и Норвегии. Всего в анализ по выявлению подвидовой структуры кулика-сороки на территории Беларуси включено 15 нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COI*. Длина анализируемого участка составила 575 п. н.

Для выделения ДНК использовали наборы Genomic DNA Purification Kit (производство Fermentas) и DNEasy Blood and Tissue Kit (производство QIAGEN) согласно стандартным протоколам. Амплификацию в указанных в табл. 1 условиях проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл 10 × буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 мкл 10 × смеси dNTPs, 1,5 мМ MgCl_2 , по 5 pmol праймеров Falco FA (5'-tcaacaaccasaagacatcgccac-3') и Vertebr R1 (5'-tagacttctgggtggccaagaatca-3'), 0,01 единицы Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК исследуемых образцов. Все компоненты для ПЦР смесей произведены ОДО «Праймтех». В работе использовали амплификатор модели Px2 Thermal Cycler (Thermo, США).

Продукты амплификации подвергали электрофоретическому разделению в 1,2 %-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. В качестве маркеров молекулярного веса использовали 100 bpLadder (Fermentas).

Т а б л и ц а 1. Температурный и временной режимы проведения ПЦР

Этап ПЦР	Температура, число циклов		Время
Начальная денатурация	95 °С		1 мин
Денатурация	95 °С	30 циклов	30 с
Отжиг праймеров	58 °С		30 с
Элонгация	72 °С		1,5 мин
Финальная элонгация	72 °С		5 мин
Хранение	4 °С		∞

Секвенирование ДНК осуществляли с последующим анализом на секвенаторе Applied Biosystems 3130 в Институте биоорганической химии НАН Беларуси (г. Минск). Анализ полученных последовательностей, расчет индексов нуклеотидного (π) и гаплотипического (h) разнообразия, построение филогенетических деревьев проводили с помощью пакета программ MEGA ver. 6.0 [8]. Выбор модели филогенетических построений осуществляли с помощью встроенной программы Model Test. В качестве внешней группы привлечены последовательности *Gallinago gallinago* (JF499134.1, GU571905.1) из GenBank.

Результаты и их обсуждение. В исследованных нуклеотидных последовательностях не обнаружено инсерций, делеций и стоп-кодонов, что свидетельствует об отсутствии среди изученных образцов ДНК ядерных копий *COI*.

Среднее процентное соотношение нуклеотидов в анализируемых последовательностях выглядит следующим образом: $T = 24,4\%$, $C = 34,3\%$, $A = 25,2\%$, $G = 16,0\%$. В анализируемой последовательности обнаружено 7 переменных сайтов, что составляет 1,2 % от их общего количества. На долю парсимониально-информативных сайтов приходится 0,2 % (1 сайт). В рассматриваемых последовательностях трансверсий не выявлено. Наиболее частыми транзициями были пиримидин-пиримидиновые: $T \leftrightarrow C$ (34,35 %). Среди анализируемых 15 особей кулика-сороки обнаружено 4 гаплотипа (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Описание гаплотипов кулика-сороки

Гаплотип	COX 1							Представленность в выборке, %	Образцы	Распространение
	125	155	170	353	359	515	545			
G1 (8)	G	A	T	T	A	T	T	53	F00215, F00214, EF514936.1, GU571918.1, GU571427.1, GQ481973.1, GQ481971.1, GQ481972.1	Беларусь (г. Браслав), Швеция (Gotland, Burs, Bandlundsviden, Burs, Bandlundsviden), Нидерланды, Норвегия (Troms, Langnes Flyplass), Россия (Свердловская обл., Красноуфимск; Мурманская область, Умба, берег Кандашской губы; Астраханская обл., Астрахань)
G2 (5)	*	*	*	*	*	*	C	33	KOY055, TMA65, F00518, F00514, 0813/1	Беларусь (окр. г. Туров), Россия (г. Киров)
G3 (1)	*	*	C	*	*	*	T	7	GU571919.1	Швеция (Stockholm, Furusundsbron, Norrtälje, Furusund)
G4 (1)	A	G	*	C	G	C	T	7	CVH3466	Россия (о. Сахалин, Ногликский р-н, сев. Коса залива Чайво, горловина залива Айтол (Пильгун))

Примечание. Жирным шрифтом выделены парсимониально информативные сайты; в скобках после названия гаплотипа указано число особей с этим гаплотипом.

Полученные гаплотипы с наибольшей представленностью в выборке (G1, G2) в основном соответствуют ареалам обитания двух подвидов кулика-сороки. Оставшихся два уникальных

гаплотипа (G3, G4) стоят отдельно от вышеуказанных. Гаплотип G4 соответствует особи с территории о. Сахалин. Выделение последней в отдельный гаплотип обусловлено, скорее всего, ее географической удаленностью от основного ареала обитания и, как следствие, ее изолированностью. Что касается особи из Швеции (G3), то ее отдельное положение объяснить сложнее. Объяснением данного факта может быть залет особи с краевой зоны ареала или принадлежность к иной, оседлой, географической популяции.

Более подробно картину разделения выделенных гаплотипов кулика-сороки демонстрирует дендрограмма генетических различий, построенная по методу максимального правдоподобия (ML) с использованием модели Hasegawa–Kishino–Yano (рис. 2).

Как видно из рис. 2, наблюдается четкое разделение гаплотипов G1 и G2, которые формируют два обособленных кластера (ИБ = 36 % и ИБ = 59 %). Последние включают (на основании географической локализации анализируемых последовательностей) особей двух подвидов кулика-сороки: *H. o. ostralegus* (ИБ = 36 %) и *H. o. longipes* (ИБ = 59 %). Последовательности первого кластера (ИБ = 36 %) относятся к особям из Норвегии, Швеции, Нидерландов, северо-запада России (Мурманская область), северо-запада Беларуси (г. Браслав). Кроме того, в данный кластер вошли последовательности особей из Астраханской и Свердловской областей. Во второй кластер (ИБ = 59 %) вошли, главным образом, особи с территории Беларуси (окр. г. Турова), а также одна особь с территории России (г. Киров).

На основании полученных данных и имеющихся сведений по расположению рефугиумов в плейстоцене [9] можно составить вероятную схему расселения указанных выше двух форм рассматриваемого вида в голоцене (рис. 3).

Изначальным в эволюции рассматриваемых двух подвидов кулика-сороки, видимо, следует считать гаплотип G1. В условиях ледникового разделения и достаточно длительной изоляции популяций данного вида в двух географически сильно удаленных рефугиумах, расположенных на европейском Атлантическом побережье и в восточноевропейском регионе, восточная популяция дивергировала, в ее генофонде появился и закрепился гаплотип G2. Черные стрелки на рис. 3

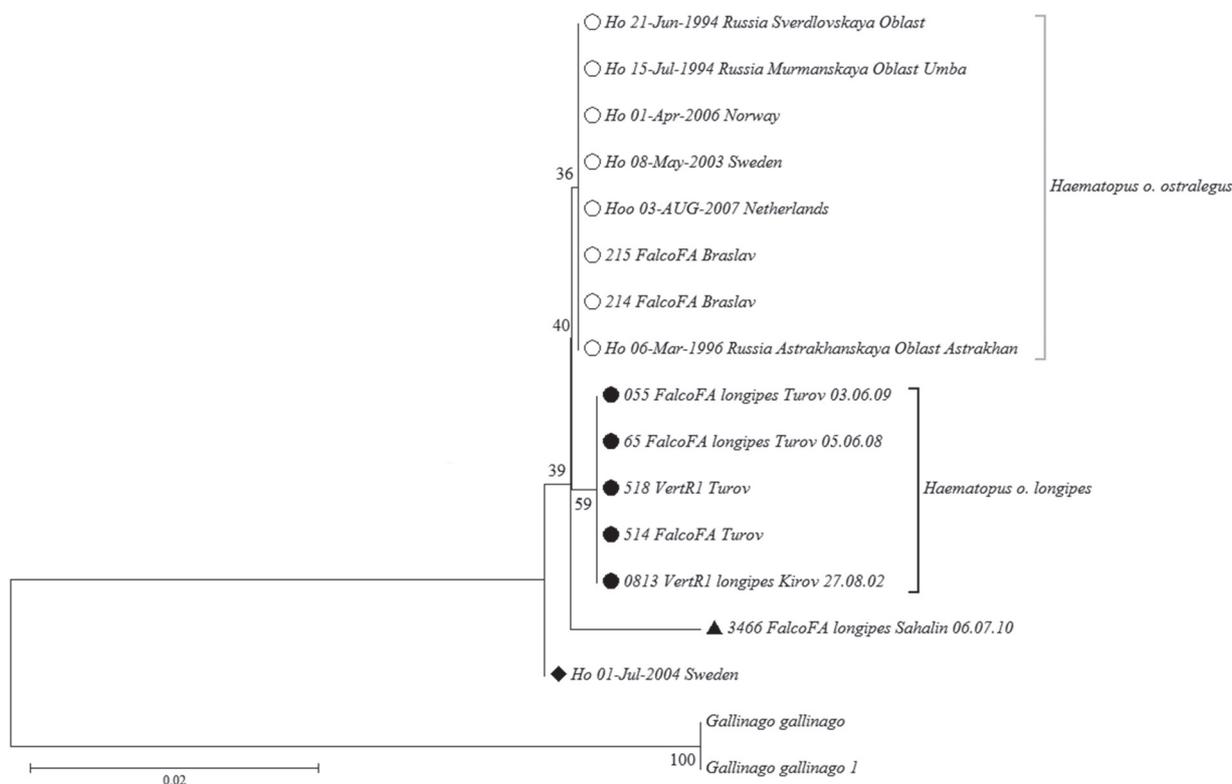


Рис. 2. Дендрограмма генетических различий (метод ML, модель НКУ; ИБ ≥ 50 %, 500 репликаций) между особями кулика-сороки. ○ – G1, ● – G2

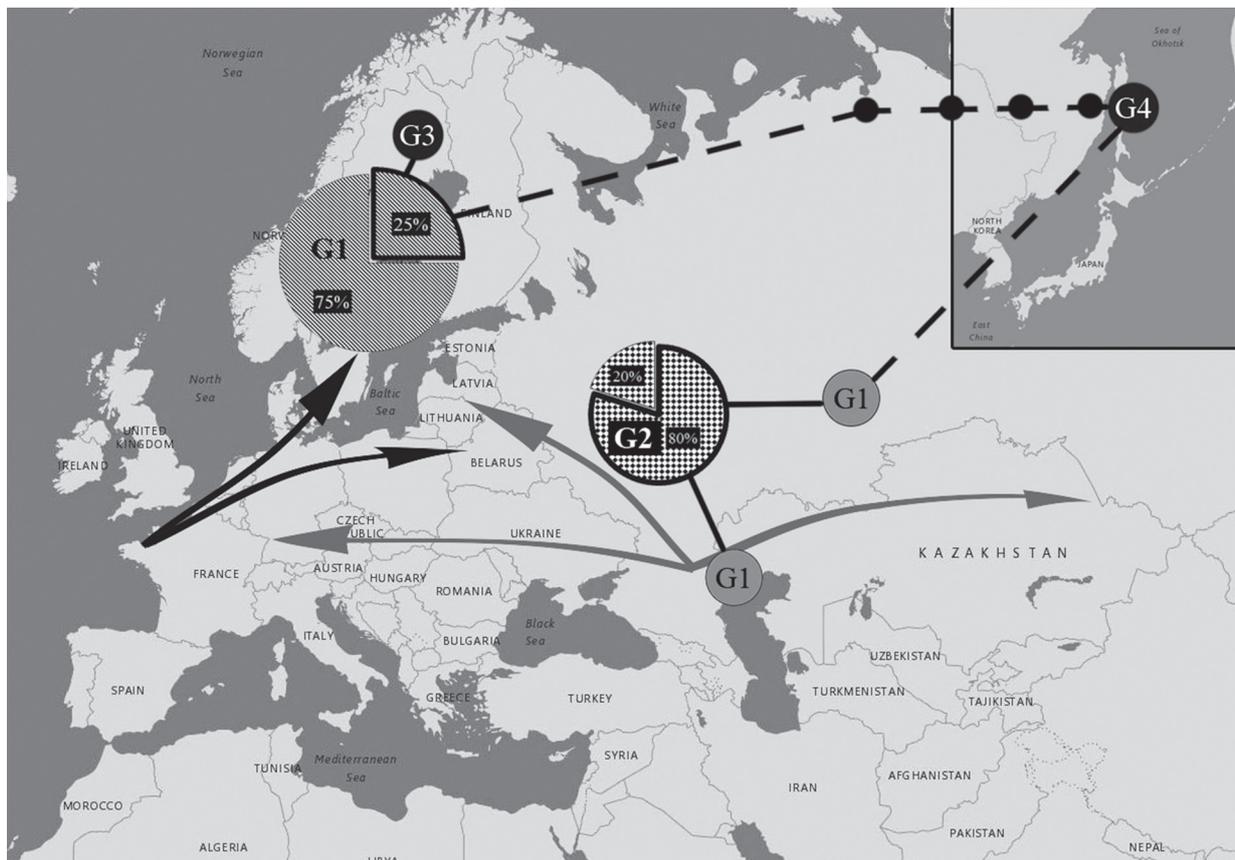


Рис. 3. Схема расселения морской и континентальной форм кулика-сороки в голоцене. Сектора, выделенные черным контуром, соответствуют доле проб из Беларуси

указывают на направление расселения птиц скандинаво-балтийского орнитофаунистического голоценового комплекса, в том числе подвида *H. o. ostralegus* с гаплотипом G1, из рефугиума, расположенного на европейском Атлантическом побережье. Серыми стрелками обозначено направление расселения птиц европейско-центральноазиатского орнитофаунистического голоценового комплекса, в том числе подвида *H. o. longipes* с гаплотипом G2, из рефугиума, расположенного в восточноевропейском регионе.

При дальнейшем продвижении в северо-западном направлении популяция континентального подвида с гаплотипом G2 достигла пределов распространения популяции номинативного морского подвида, расселявшегося через Скандинавию и Балтику в юго-восточном направлении. Такой контакт двух подвидов отмечен как раз на территории Беларуси, что описано ранее в работе [2]. Результатом этого контакта стало смешивание птиц двух ранее географически разобщенных подвидов. Это подтверждают результаты кольцевания куликов-сорок на юге Беларуси. По данным белорусского центра кольцевания, окольцованные птицы из ареала материкового подвида отмечены на зимовке на юге Франции, т. е. в зимовочном ареале морского подвида. Логично предположить, что наличие птиц с гаплотипом G1 на территории подвидового ареала континентальной формы кулика-сороки (особи из Астрахани и Красноуфимска) является результатом смешивания популяций в зоне вторичного контакта, что объясняет образование смешанных пар и изменение не только мест зимовок, но и мест размножения.

Гаплотип G4, наиболее удаленный от других трех гаплотипов, сформировался, скорее всего, в более ранние периоды генетической дифференциации кулика-сороки в силу значительной географической изолированности популяций о. Сахалин. Что касается особи с гаплотипом G3 из Швеции, то она скорее является результатом более поздней эволюции подвидовых форм кулика-сороки в Палеарктике.

Заклучение. Согласно полученным нами данным, на территории Беларуси присутствуют особи с гаплотипами, характерными для зон обитания *H. o. ostralegus* и *H. o. longipes*. Это подтверждает ранее высказанное предположение о гнездовании на северо-западе Беларуси морской формы *H. o. ostralegus*.

Список использованной литературы

1. Никифоров, М. Е. Новые данные о гнездовании галстучника, кулика-сороки и мородунки в Белоруссии / М. Е. Никифоров [и др.] // Орнитология. – 1991. – Вып. 25. – С. 168–169.
2. Никифоров, М. Е. К таксономическому статусу кулика-сороки (*Haematopus ostralegus* Linnaeus), обитающего в Беларуси / М. Е. Никифоров // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1998. – № 3. – С. 126–129.
3. Гречик, В. В. Географическая изменчивость птиц Беларуси (таксономический анализ) / В. В. Гречик. – Минск, 2004. – 127 с.
4. Козлов, В. П. Кулик-сорока в Белорусском Поозерье / В. П. Козлов // Тез. докл. 12-й Прибалт. орнитол. конф. – Вильнюс, 1988. – С. 92–94.
5. Hebert, P. Identification of Birds through DNA Barcodes / P. Hebert // PloS Biology. – 2004. – Vol. 2. – P. 1657–1663.
6. Baker, A. J. Countering criticism of single mitochondrial DNA gene barcoding in / A. J. Baker // Mol. Ecol. Resources. – 2009. – Vol. 9. – P. 257–268.
7. Kerr, K. C. R. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds / K. C. R. Kerr // Mol. Ecol. Notes. – 2007. – Vol. 7. – P. 535–543.
8. Tamura, K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Mol. Biol. and Evolution. – 2013. – Vol. 30. – P. 2725–2729.
9. Никифоров, М. Е. Формирование и структура орнитофауны Беларуси / М. Е. Никифоров. – Минск, 2008. – 297 с.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 577.342

И. А. ДРЕМУК, С. М. САВИНА, Е. В. ВЯЗОВ, К. О. АДАМЧИК, Н. В. КОЗЕЛ

СОДЕРЖАНИЕ ГЛУТАТИОНА И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ В КЛЕТКАХ *SPIRULINA PLATENSIS* ПРИ СВЕТОДИОДНОМ ОСВЕЩЕНИИ С РАЗНЫМ СПЕКТРАЛЬНЫМ СОСТАВОМ

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск,
e-mail: irinadremuk@yandex.ru*

При выращивании *Spirulina platensis* под синим светом выявлено снижение количества восстановленного глутатиона, а также активности глутатионредуктазы и, как следствие, накопление окисленной формы глутатиона в клетках водоросли, что снижает устойчивость *Spirulina platensis* к стрессовым воздействиям и является одной из причин уменьшения ее продуктивности.

Ключевые слова: *Spirulina platensis*, антиоксидантная система, фотосинтетически активный свет, спектральный состав, светодиоды.

I. A. DREMUK, S. M. SAVINA, Y. V. VIAZAU, K. O. ADAMCHYK, N. V. KOZEL

GLUTATHIONE CONTENT AND GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY IN *SPIRULINA PLATENSIS* CELLS UNDER LED LIGHTING WITH DIFFERENT SPECTRAL COMPOSITIONS

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: irinadremuk@yandex.ru*

Spirulina platensis grown under blue light showed a decrease in both reduced glutathione content and glutathione reductase activity and, as a result, accumulation of oxidized form of enzyme in its cells. This lowered *Spirulina platensis* stress tolerance and was one of the causes of its decreased productivity.

Keywords: *Spirulina platensis*, antioxidant system, photosynthetically active light, the spectral composition of the LEDs.

Введение. Ранее в экспериментах по изучению влияния узкополосного излучения красных и синих светодиодов и их совместного действия на динамику окислительных процессов в растениях огурца нами было показано, что светодиодное освещение с одной спектральной полосой (синей либо красной) оказывает существенное стрессовое воздействие на растительный организм, выражающееся в накоплении активных форм кислорода (АФК), в том числе пероксида водорода, а также в интенсификации процессов перекисного окисления липидов в листьях огурца [1]. Известно, что уровень АФК в растениях контролируется антиоксидантной системой, в состав которой входят низкомолекулярные соединения, из которых наиболее важными для растительной клетки являются аскорбат, токоферол, глутатион и каротиноиды, а также антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза (ГР), каталаза [2]. Среди перечисленных компонентов антиоксидантной системы растительной клетки важную роль играет глутатион, биологическая функция которого заключается в защите SH-групп белков от окисления, восстановлении H_2O_2 и других пероксидов, связывании свободных радикалов, а также поддержании пула восстановленного аскорбата. ГР – фермент, восстанавливающий дисульфидную связь окисленного глутатиона (GSSG) до его физиологически активной сульфгидрильной формы и, соответственно, поддерживающий необходимое для нормального функционирования антиоксидантной системы содержание в клетке восстановленного глутатиона (GSH).

Исследование функционирования антиоксидантной системы растительной клетки в условиях светодиодного освещения может дать представление о степени развития окислительного стресса в растениях, а также о характере протекания окислительных процессов и способности расти-

тельного организма сопротивляться стрессовому воздействию, что позволит оптимизировать спектральный состав осветителя. Оптимизация спектрального состава источников фотосинтетически активного света весьма актуальна при биотехнологическом производстве хозяйственно ценных видов водорослей, в частности *Spirulina platensis*.

Цель данной работы – выявление влияния светодиодного освещения разного спектрального состава на содержание восстановленного и окисленного глутатиона, а также на активность глутатионредуктазы в клетках *Spirulina platensis*.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали трихомную сине-зеленую водоросль *Spirulina (Arthrospira) platensis* (штамм IBCE S-2 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси) [3]. Водоросль выращивали в течение 7 дней на среде Зарроука [4] в стеклянных колбах объемом 200 мл (рабочий объем 100 мл) в режиме 14 ч света – 10 ч темноты при температуре 25 ± 2 °С. Для выращивания *Spirulina platensis* использовали светодиодный осветитель, сконструированный в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [5], с различными комбинациями синего (450–465 нм), голубого (465–485 нм), желтого (590–595 нм) и красного (630–650 нм) светодиодов (потребляемая мощность одного светодиода около 1 Вт), а также люминесцентную лампу Philips PL-S 11W/827/2P с потребляемой мощностью 11 Вт, цветовой температурой 2700 К и светоотдачей 64 Лм/Вт в качестве контроля. Показатели интенсивности световых потоков лампы и светодиодного осветителя изначально были выравнены по энергии и составляли 5 мВт/см².

Продуктивность *Spirulina platensis* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензии при 560 нм на спектрофотометре Metertech SP-830 Plus (Тайвань) [6]. Определение GSSG и GSH проводили с помощью спектрофлуорометрического метода [7], модифицированного в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [8]. Активность ГР определяли по кинетике потребления НАДФН, которую регистрировали по уменьшению оптической плотности при 340 нм в течение 5 мин ($\epsilon = 6,2 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [9]. Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, вычисленные в результате трех независимых опытов. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 12.5.

Результаты и их обсуждение. *Spirulina platensis* выращивали с помощью светодиодов с полосоми испускания в красной и синей областях спектра. Попытка использовать именно такие светодиоды для культивирования водорослей не случайна, так как в фотосинтезирующих организмах в качестве основных пигментов-светосборщиков выступают хлорофилл и каротиноиды, которые наиболее эффективно поглощают свет в указанной области спектра. Именно этими критериями руководствуется большинство исследователей, применяя для выращивания растений разные комбинации только синих и красных светодиодов и исключая из спектра излучения зеленый свет [10, 11]. Для выращивания *Spirulina platensis* кроме классических красного и синего светодиодов и их комбинации (красный:синий – 2:1 по энергии излучения) нами использован также осветитель более сложной конструкции, в спектре излучения которого содержался дополнительно желтый и голубой свет (красный:желтый:голубой:синий – 3:3:1:1 по энергии излучения). Как показано нами ранее, такой вариант светодиодного освещения приводит к повышению синтеза в клетках *Spirulina platensis* светособирающего пигмента фикоцианина, который также является ценным антиоксидантом, что важно учитывать при культивировании водоросли в промышленных условиях для получения биомассы высокого качества [3]. Все использованные в работе варианты светодиодного освещения, за исключением синего, позволили добиться на 17–31 % более высокой продуктивности *Spirulina platensis* по сравнению с контрольным вариантом, выращенным под люминесцентной лампой (см. таблицу). При использовании синего света наблюдалось двукратное снижение продуктивности водоросли.

Изменение продуктивности *Spirulina platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль)

Показатель	Вариант освещения				
	Красный + желтый + голубой + синий (3:3:1:1)	Красный	Красный + синий (2:1)	Синий	Белый (контроль)
Продуктивность, мг/л	696,4 ± 21,6	782,2 ± 40,0	715,1 ± 19,7	322,8 ± 12,5	595,8 ± 34,3

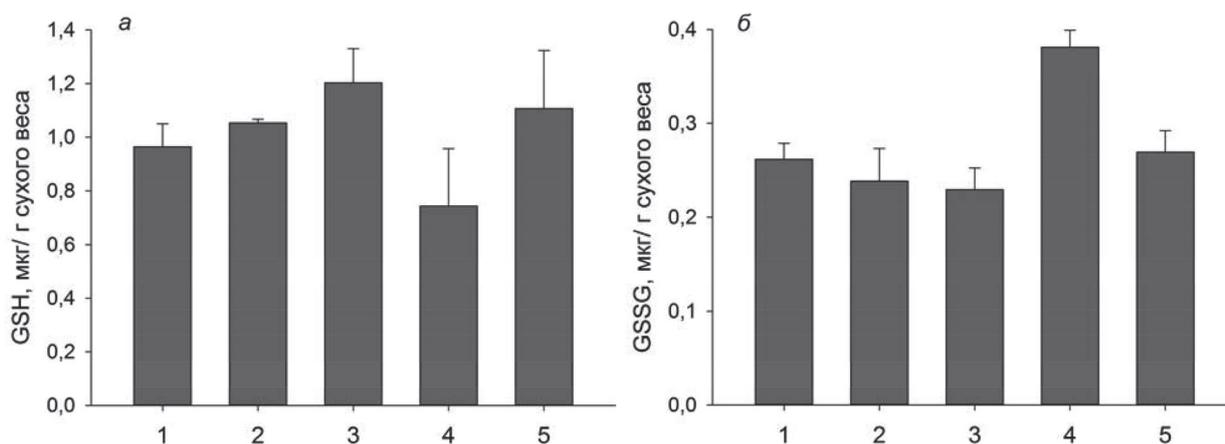


Рис. 1. Изменение содержания восстановленного (а) и окисленного (б) глутатиона в клетках *Spirulina platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль). Здесь и на рис. 2 варианты освещения *Spirulina platensis*: 1 – красный + желтый + голубой + синий (в соотношении 3:3:1:1 по энергии излучения), 2 – красный, 3 – красный + синий (в соотношении 2:1 по энергии излучения), 4 – синий, 5 – белый свет

Для анализа состояния антиоксидантной системы *Spirulina platensis* в условиях светодиодного освещения разного спектрального состава изучали изменение количества GSH и GSSG, а также активности ГР в клетках водоросли. Установлено, что соотношение GSH и GSSG существенно отличается от контроля только в варианте с использованием синего света (рис. 1, вариант 4). В этом варианте наблюдается истощение (на 33 % по отношению к контролю) пула GSH и повышенное накопление (на 42 % по отношению к контролю) его физиологически неактивной окисленной формы, что обычно приводит к негативному эффекту при окислительном воздействии. Отметим, что в варианте с использованием совместно синего и красного света (рис. 1, вариант 3), наоборот, количество GSH было несколько выше контроля (на 9 %), а GSSG – ниже на 14 %, что указывает не только на активацию антиоксидантной системы в клетках водоросли при таком воздействии, но и на наличие некоторого стрессового воздействия.

Анализ активности ГР показал существенное снижение (на 43 % по отношению к контролю) активности этого фермента в варианте с использованием синего света (рис. 2, вариант 4), что объясняет накопление GSSG и снижение количества GSH. Однако отметим, что в целом общее содержание глутатиона в этом варианте снижалось по отношению к контролю и другим вариантам, что является следствием не низкой активности ГР, а либо активным потреблением этого антиоксиданта в защитных реакциях, либо нарушением его синтеза. В варианте с использованием совместно красного и синего света активность ГР была самой высокой – на 12 % выше контроля, что также согласуется с результатами анализа количества GSH и GSSG и, как было отмечено

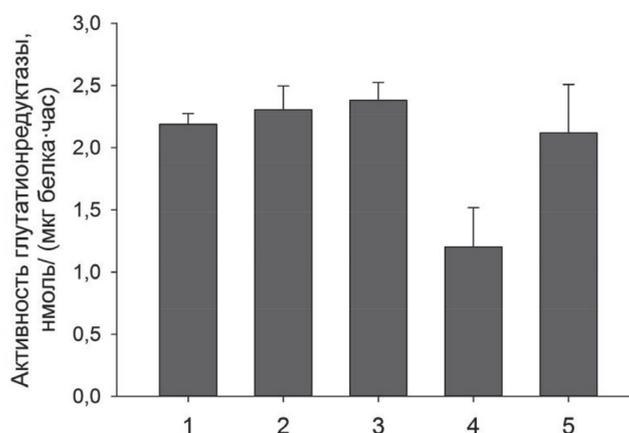


Рис. 2. Изменение активности глутатионредуктазы в клетках *Spirulina platensis* при выращивании под светодиодными осветителями и люминесцентной лампой Philips (контроль)

выше, может указывать и на наличие некоторого стрессового воздействия на клетки водоросли при таком освещении.

Заключение. Таким образом, в варианте с использованием синего света выявлено снижение количества восстановленного глутатиона, а также активности глутатионредуктазы и, как следствие, накопление окисленной формы глутатиона в клетках *Spirulina platensis*, что снижает устойчивость водоросли к стрессовым воздействиям и является одной из причин уменьшения ее продуктивности. Остальные исследованные модификации спектрального состава не оказывали существенного влияния на указанные компоненты антиоксидантной системы *Spirulina platensis* и позволили добиться на 17–31 % более высокой продуктивности водоросли по сравнению с контролем.

Список использованной литературы

1. Вязов, Е. В. Содержание активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и проницаемость клеточных мембран в растениях огурца (*Cucumis sativus*) в условиях узкополосного освещения / Е. В. Вязов, Н. В. Шалыго // Вестн. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2013. – № 2. – С. 71–74.
2. Козел, Н. В. Антиоксидантная система листьев ячменя при фотоокислительном стрессе, индуцированном бенгальским розовым / Н. В. Козел, Н. В. Шалыго // Физиол. раст. – 2009. – Т. 56, № 3. – С. 351–358.
3. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / С. С. Мельников [и др.]. – Минск, 2011. – С. 24–26.
4. Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438) / S. Cheevadhanarak [et al.] // Stand. Genomic Sci. – 2012. – Vol. 6, N 1. – P. 43–53.
5. Доманский, В. П. Особенности выращивания *Spirulina Platensis* при использовании светодиодных источников света / В. П. Доманский, Н. В. Козел // Вестн. НАН Беларуси. – Сер. биол. наук. – 2013. – № 3. – С. 56–59.
6. Promotive Effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K. Sasaki [et al.] // J. of Fermentation and Bioengineering. – 1995. – Vol. 79, N 5. – P. 453–457.
7. Hissin, P. J. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues / P. J. Hissin, R. Hilf // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 74, N 1. – P. 214–226.
8. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях / Н. В. Шалыго [и др.] // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 264–270.
9. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes / T. Gechev [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59, N 4. – P. 708–714.
10. Фотосинтез и продуктивность растений картофеля в условиях различного спектрального облучения / Ю. Ц. Мартиросян [и др.] // С.-х. биология. – 2013. – № 1. – С. 107–112.
11. Фотохимическая и фосфорилирующая активность хлоропластов и мезоструктура листьев китайской капусты при выращивании под светодиодами / О. В. Аверчева [и др.] // Физиол. раст. – 2010. – Т. 57. – С. 404–414.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 639.21:567.5(476)

А. В. ЗУБЕЙ

**ПРОМЫСЛОВЫЕ РЫБЫ СУБФОСИЛЬНОЙ КОЛЛЕКЦИИ АРХЕОЛОГИЧЕСКОГО
ПАМЯТНИКА ВИТЕБСК, ВЕРХНИЙ ЗАМОК (р. ЗАПАДНАЯ ДВИНА)**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: zubey@mail.ru*

На основании изучения остеологического материала из раскопов древнего города приведен видовой состав рыб (18 видов). Определен возраст для 14 видов рыб, размеры – для 5. Установлено, что основными промысловыми видами для жителей древнего города были рыбец *Vimba vimba* (L.) (27,0 % от общего числа субфоссильных остатков), лещ *Abramis brama* (L.) (22,5 %) и елец обыкновенный *Leuciscus leuciscus* (L.) (11,8 %). В результате археоихтиологических исследований впервые выявлено, что для субфоссильной коллекции на территории Беларуси характерна высокая доля проходных и реофильных видов рыб (53,1 %), в том числе исчезнувших из Западной Двины осетра атлантического и кумжи обыкновенной. Промысел в XIII–XVI вв. базировался на старших возрастных группах рыб (от 4 до 15 лет), в то время как в XX – начале XXI в. промысловая нагрузка приходилась в основном на младшие возрастные группы рыб (от 2 до 3 лет).

Ключевые слова: остеологический материал, археологические памятники, промысловые виды, проходные рыбы, Acipenseridae – Осетровые, *Acipenser sturio* L. – осетр, *Vimba vimba* (L.) – рыбец.

A. V. ZUBEI

**COMMERCIAL FISH OF SUBFOSSIL COLLECTION OF ARCHAEOLOGICAL SITE VITEBSK,
UPPER CASTLE (r. ZAPADNAYA DVINA)**

*Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: zubey@mail.ru*

Based on the study of osteological material from the excavation of the ancient city a species composition of fish (18 species) is given. Defined the age for 14 species of fish, the sizes for 5 species. It was found that the main commercial species for the inhabitants of the ancient city were vimba *Vimba vimba* (L.) (27.0 % of the total number of subfossil residues), bream *Abramis brama* (L.) (22.5 %) and common dace *Leuciscus leuciscus* (L.) (11.8 %). Subfossil collection is characterized by a high proportion of migratory species of fish and rheophilic (53.1 %), including the disappeared from the Western Dvina in Belarus, the Baltic sturgeon and trout ordinary that revealed for the first time for Belarussian archeoichthyological research. Fishing in XIII – XVI centuries based on the older age groups of fish (4 to 15) as opposed to fishing in the XX – beginning of XXI century, when fishing load falls mainly on the younger age groups of fish (2 to 3).

Keywords: osteological material, archaeological sites, commercial species, anadromous fish, *Acipenseridae* – Sturgeons, *Acipenser sturio* L. – Sturgeon, *Vimba vimba* (L.) – vimba.

Введение. Изучение фауны рыб с использованием археоихтиологических данных разных исторических периодов дает более полное представление о видовом и возрастном составе промысловых уловов древних людей в водоемах/водотоках Беларуси, а кроме того, позволяет охарактеризовать состояние древнего рыболовного промысла и сравнить возрастные показатели рыб в древних и современных уловах.

Цель исследования – установление видового состава рыб коллекции субфоссильных остатков промысловых видов рыб археологического памятника Витебск, Верхний Замок (раскопки 1982–1993 гг., автор Л. В. Колединский) и сравнение видового состава и возраста рыб из древних уловов с аналогичными данными из современных промысловых уловов.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили субфосильные остатки рыб из раскопов двух культурных слоев археологического памятника Витебск, Верхний Замок: слой XII – начала XIV в. (замок-резиденция удельных князей) и слой XV–XVI вв. (город с самоуправлением согласно магдебургскому праву). Датировка большинства субфосильных остатков рыб относится к двум культурным пластам начала XIV в., временные пределы датировки находок – к XII–XVI вв. Территориально археологический памятник располагался на правом берегу р. Западная Двина в черте современного Витебска. Видовую принадлежность субфосильных остатков, а также возраст и размеры рыб определяли по чешуе и костям согласно установленным методикам [1, 2]. Определение видов рыб по субфосильной чешуе проводили по коллекции эталонов чешуй современных промысловых видов рыб Беларуси, собранной и определенной автором данной публикации (коллекция эталонов чешуй современных промысловых видов рыб водоемов Беларуси находится в ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»). Сведения о видовой принадлежности костей рыб, а также о восстановленных размерах рыб любезно предоставлены Э. А. Лешкевич. Для сравнения видового состава рыб древних и современных уловов использованы также данные анализа промысловых уловов из бассейна р. Западная Двина за период с середины XX до начала XXI в.

Результаты и их обсуждение. Коллекция субфосильных остатков промысловых видов рыб археологического памятника Витебск, Верхний Замок состоит из 389 элементов, из которых 187 экз. определено до вида, 64 экз. – до семейства (все они принадлежат сем. Карповые), не определенных костей – 2 экз., обломков чешуи карповых рыб – 136 экз.

Видовой состав рыб, количество субфосильных остатков рыб, а также их доля (%) в археологической коллекции приведены в порядке убывания, после объединения данных с разной датировкой XIII–XVI вв. (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Видовой состав рыб ($n = 18$), количество и доля субфосильных чешуй из раскопов археологического памятника Витебск, Верхний Замок

Вид рыб		К-во субфосильных чешуй		
Латинское название	Русское название	экз.	%	всего
<i>Vimba vimba</i> (L.)	Рыбец	50	27,0	187
<i>Abramis brama</i> (L.)	Лещ	42	22,5	
<i>Leuciscus leuciscus</i> (L.)	Елец обыкновенный	22	11,8	
<i>Rutilus rutilus</i> (L.)	Плотва обыкновенная	16	8,6	
<i>Esox lucius</i> L.	Щука обыкновенная	14	7,5	
<i>Aspius aspius</i> (L.)	Жерех обыкновенный	13	7,0	
<i>Abramis ballerus</i> (L.)	Синец	7	3,7	
<i>Blicca bjoerkna</i> (L.)	Густера	5	2,7	
<i>Leuciscus cephalus</i> (L.)	Голавль	4	2,1	
<i>Perca fluviatilis</i> L.	Окунь речной	3	1,6	
<i>Salmo trutta</i> L.	Кумжа обыкновенная	2	1,0	
<i>Scardinius erythrophthalmus</i> (L.)	Красноперка	2	1,0	
<i>Stizostedion lucioperca</i> (L.)	Судак обыкновенный	2	1,0	
<i>Leuciscus idus</i> (L.)	Язь	1	0,5	
<i>Tinca tinca</i> (L.)	Линь	1	0,5	
<i>Gymnocephalus cernuus</i> (L.)	Ерш обыкновенный	1	0,5	
<i>Acipenser sturio</i> L.	Осетр атлантический	1	0,5	
<i>Silurus glanus</i> L.	Сом европейский	1	0,5	

Наибольшая доля принадлежит рыбку, лещу и ельцу – 27,7; 22,5 и 11,8 % соответственно. Столь значительное присутствие субфосильных остатков этих видов рыб в коллекции можно объяснить только массовостью этих рыб в древних уловах.

Из субфосильных остатков, таксономическая принадлежность которых определена до вида, преобладают остатки сем. Карповые (87,4 %), которое представлено в коллекции 11 видами из 18. Меньшую долю (7,5 %) занимает в коллекции сем. Щуковые. На третьем месте семейства

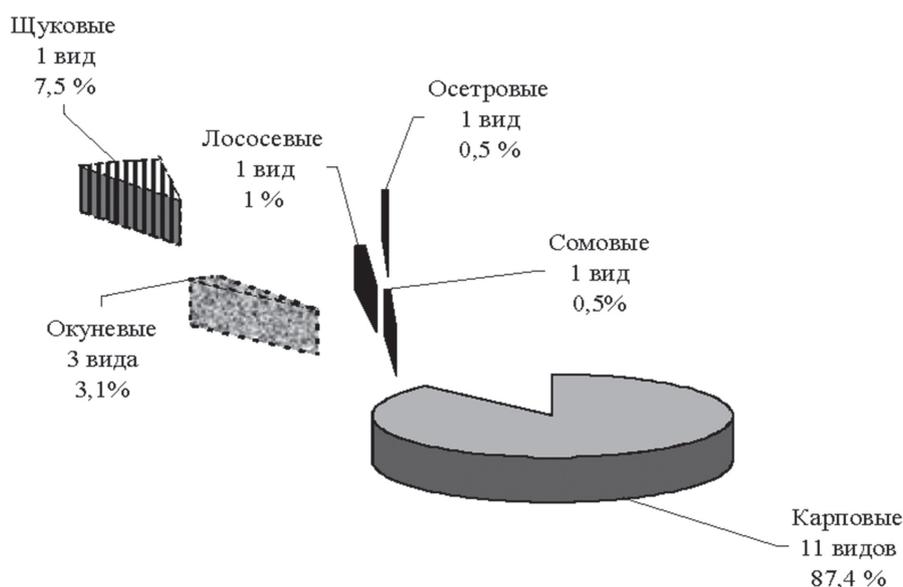


Рис. 1. Таксономический состав и доля видов рыб коллекции субфоссильных остатков промысловых рыб археологического памятника Витебск, Верхний Замок XIII–XVI вв.

Окуневые – 3,1 % (3 вида рыб), затем Лососевые (1,0 %), Сомовые и Осетровые (по 0,5 %), каждое из которых представлено одним видом рыб (рис. 1).

Возраст и линейные размеры рыб археологического памятника Витебск, Верхний Замок (по субфоссильным остаткам). В результате исследований субфоссильных остатков промысловых рыб археологического памятника Витебск, Верхний Замок определен возраст для 113 экз. древних рыб – от 4 до 15 полных лет, а также количество возрастных групп в уловах древних людей – 12 (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Количество видов рыб разного возраста из коллекции субфоссильных остатков рыб ($n = 113$) археологического памятника Витебск, Верхний Замок

Возраст рыб, полных лет	Вид рыб, экз.													
	Рыбец	Лещ	Елец	Жерех	Плотва	Щука	Синец	Окунь	Густера	Кумжа	Голавль	Линь	Ерш обыкновенный	Красноперка
4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
5	6	0	9	5	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1
6	13	0	4	4	4	2	1	1	0	0	0	0	0	0
7	12	0	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
8	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
9	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
12	0	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
13	0	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
14	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Всего	31	25	19	11	8	5	3	3	2	2	1	1	1	1

Кроме определения возраста по субфоссильным костям установлены размеры рыб для 5 видов. Длина 4 щук определена по *vertebrae* (40 см), *operculum* (50 см) и *dentale* (77 и 110 см). Длина судака восстановлена для трех рыб по *dentale* (55 и 60 см) и *praeoperculum* (40 см). По данному показателю несколько большее количество рыб (6 экз.) восстановили по *operculum* и *praeoperculum* для леща – 24, 24, 36, 36, 40, 45 см, по одному для синца – 45 см (восстановили по *cleithrum*) и сома – 150 см (восстановили по *coracoid*).

В связи с тем что выборка линейных размеров рыб, полученная в результате расчета по субфоссильным остаткам, была малочисленной, сравнение восстановленной длины рыб с длиной рыб из современных уловов не проводили.

Анализ видового состава рыб из промысловых уловов XIII–XVI и середины XX – начала XXI в. Для сравнения видового состава древних уловов с современными были проанализированы данные рыбопромысловой статистики за 1964–2009 гг. из бассейна р. Западная Двина и озер Добрино, Городно, Полонское, Мошно и Сосна, окружающих археологический памятник. Исходя из статистических данных, в этот период промыслом в вышеуказанном бассейне было охвачено 20 товарных сортов промысловых рыб (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Качественный состав современных промысловых уловов рыбы из водоемов бассейна р. Западной Двины в Витебском районе Витебской области за 1964–2009 гг.

Товарный сорт	Виды рыб, составляющих товарный сорт
Лещ	Лещ
Судак	Судак обыкновенный
Щука	Щука обыкновенная
Окунь	Окунь речной
Плотва	Плотва обыкновенная
Густера	Густера
Карп	Карп обыкновенный (сазан)
Линь	Линь
Ерш	Ерш обыкновенный
Жерех	Жерех обыкновенный
Язь	Язь
Сом	Сом европейский
Красноперка	Красноперка
Карась	Карась серебряный, карась обыкновенный
Голавль	Голавль
Налим	Налим обыкновенный
Уклея	Уклея обыкновенная
Мелочь 3	Синец, елец обыкновенный и молодь семейств Карповые и Окуневые (отмечены выше в таблице)
Мелочь 2	
Мелочь 1	

Исходя из того что такие товарные сорта, как карась и мелочь групп 3, 2, 1, состояли из двух и четырех (двух отдельно не учитываемых) видов рыб соответственно, промыслом в бассейне р. Западная Двина было охвачено 20 видов рыб. Согласно данным рыбопромысловой статистики, из современных промысловых уловов исчезли осетр атлантический, кумжа, а также рыбец, но появились интродуцированные в данный водоток виды рыб – карп и карась серебряный. Причины отсутствия осетра, кумжи и рыбца в современных уловах не однозначны. Точной даты исчезновения осетра атлантического из р. Западная Двина на территории современной Беларуси нет, но уже в XIX в. при описании видового состава двинских рыб А. П. Сапунов указывал на низкую численность этой рыбы в промысле в районе г. Риги, а подъем осетра в верховья реки автор категорически отрицал [3]. Ранее, в XII–XIII вв. [4, 5], считалось, что осетр атлантический поднимался на нерест только до р. Друйки и заходил в озера Недрово, Неспиш и Потех. Но обнаружение остатков осетра в раскопах археологического памятника Витебск, Верхний город свидетельствует о более обширном ареале данного представителя осетровых в древности.

Кумжа – также типично проходная рыба, но со второй половины XX в. в р. Западная Двина на территорию Беларуси она перестала подниматься в результате перекрытия водотока плотинами ГЭС. Рыбец (сырть) внесен в последнее издание Красной книги [6] и подлежит выпуску из промысловых снастей в живом виде, поэтому и не учитывается данными рыбопромысловой статистики. Елец и синец в настоящее время встречаются в бассейне р. Западная Двина, но в промысловых уловах эти виды фиксировались в составе таких товарных сортов, как мелочь групп 3, 2, 1. Отсутствие в субфоссильной коллекции остатков уклеи и налима свидетельствует о плохой

сохранности в культурных слоях археологического памятника чешуи (уклейка) и костей (налим) данных видов рыб. Отсутствие субфоссильных остатков карася золотого может указывать на незначительную долю привозной рыбы, добытой в озерах вокруг древнего поселения.

Анализ возраста основных промысловых рыб из уловов XIII–XVI и середины XX – начала XXI в. Для сравнения возрастного состава рыб, добытых древними жителями в XIII–XVI вв., с возрастным составом рыб из современных уловов, определен возраст по чешуе для ряда видов рыб. Для сравнения с возрастными показателями рыб из древних уловов аналогичные показатели были взяты из литературных источников [7] и научных данных лаборатории ихтиологии об уловах из водоемов бассейна р. Западная Двина. С этой целью были отобраны наиболее многочисленно представленные в древних уловах три вида рыб – рыбец, лещ и елец.

При сравнении возраста вышеперечисленных видов рыб оказалось, что основу уловов в XIII–XVI вв. составляли особи более старших возрастных групп (от 4+ для всех отмеченных в табл. 2 промысловых видов рыб). Напротив, основу уловов рыбака, леща и ельца в XX – начале XXI в. из бассейна р. Западная Двина составляли особи более младших возрастных групп – от 2 лет для всех видов перечисленных выше рыб [6].

Для наглядности сравнения абсолютные цифры количества особей рыб каждой возрастной группы как из древних, так и из современных уловов были переведены в относительные (%) и на основе этих данных были построены графики (рис. 2–4).

Так, рыбец в уловах XIII–XVI вв. был представлен тремя возрастными группами (от 5 до 7 лет), но наибольшую долю в уловах (41,9 %) составляли рыбы в возрасте 6 лет. В уловах середины XX в. этот вид рыб был представлен также тремя возрастными группами (от 5 до 7 лет), но наибольшую долю в уловах (54,8 %) составляли рыбы в возрасте 5 лет.

В уловах XIII–XVI вв. лещ представлен 8 возрастными группами (от 8 до 15 лет), но наибольшую долю в уловах составляли рыбы в возрасте 9 и 10 лет (по 20,0 % каждая). В промысловых уловах начала XXI в. этот вид рыб отмечен 13 возрастными группами. Леща вылавливали в возрасте 2–14 лет, но наиболее массовой (25,7 %) в уловах была группа рыб в возрасте 3 лет.

Елец в древних уловах отмечен тремя возрастными группами – от 4 до 6 лет, но наибольшую долю в уловах (68,5 %) составляли рыбы в возрасте 5 лет. В рыбном промысле середины XX в. отмечено 4 возрастных группы этого вида (от 2 до 5 лет), а наибольшую долю в уловах (51,4 %) составляли рыбы в возрасте 2 лет.

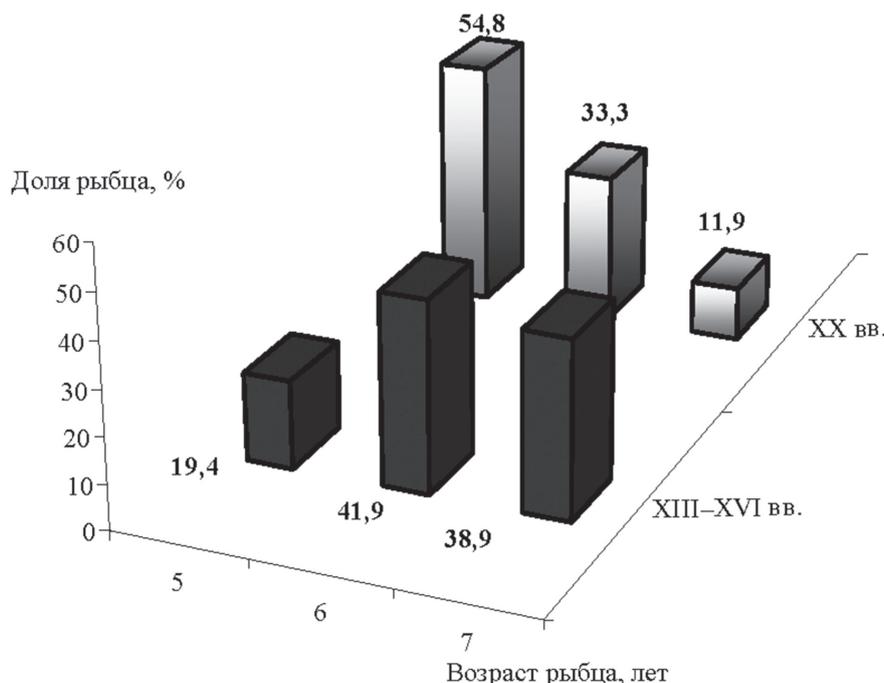


Рис. 2. Доля рыбака разного возраста в уловах XIII–XVI и XX вв.

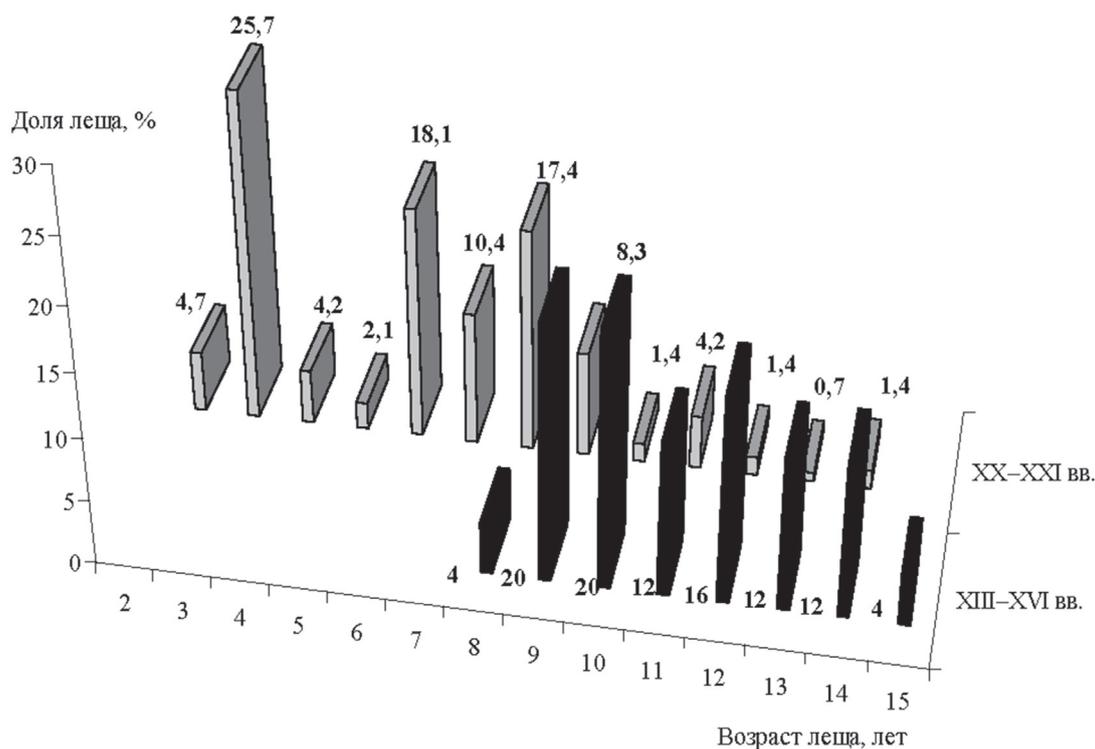


Рис. 3. Доля леща разного возраста в уловах XIII–XVI и XX – начала XXI в.

Анализ экологических групп промысловых рыб субфоссильной коллекции. В результате анализа рыб субфоссильной коллекции можно выделить следующие экологические группы рыб (рис. 5).

Группа общепресноводных (озерно-речных) рыб, самая многочисленная, включает 11 видов – щуку, леща, густеру, язя, плотву обыкновенную, красноперку, линя, окуня, ерша обыкновенного, судака и сома (рис. 5).

Кроме общепресноводных рыб необходимо выделить группу из 4 рыб-реофилов, в которую входят синец, жерех, елец и голавль. Все виды-реофилы и общепресноводные сохранились

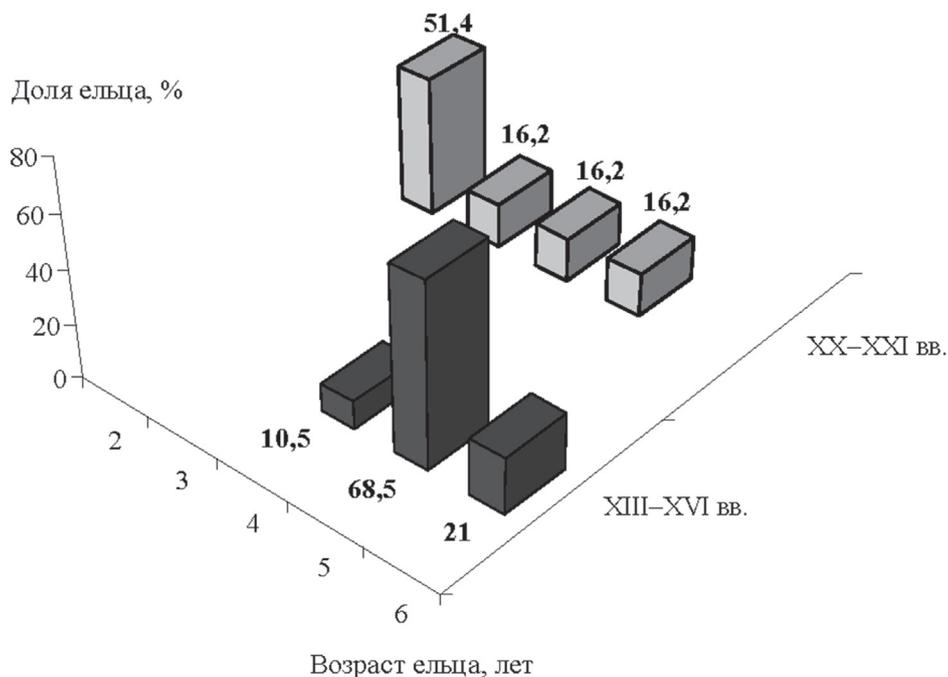


Рис. 4. Доля ельца разного возраста в уловах XIII–XVI и XX вв.

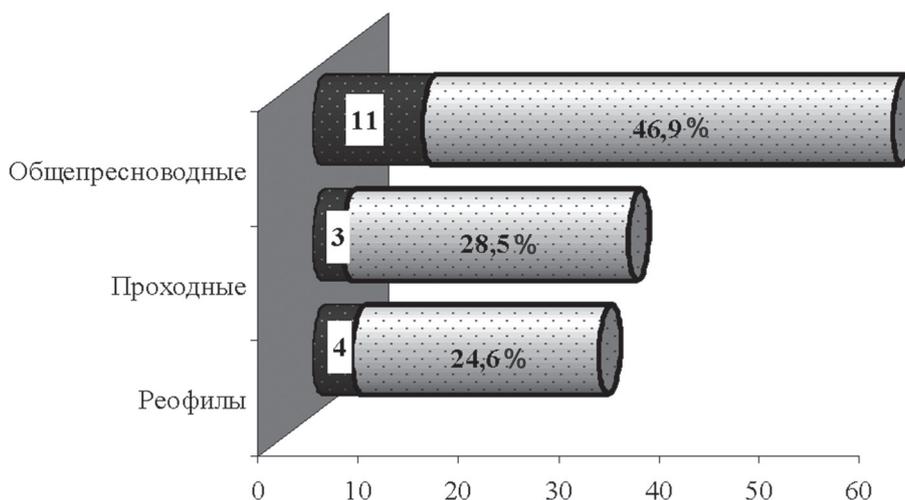


Рис. 5. Количество и доля (%) видов рыб разных экологических групп в уловах XIII–XVI вв.

до настоящего времени в бассейне р. Западная Двина на территории Беларуси. Отдельно следует отметить три вида проходных рыб – осетра атлантического, кумжу и рыбца.

Несмотря на то что количество видов общепресноводных рыб больше, их доля (46,9 %) несколько меньше, чем совместная доля реофилов и проходных рыб (53,1 %). Исходя из этого, можно считать, что рыболовный промысел древние жители Витебска вели преимущественно в русле р. Западная Двина.

Заключение. В результате исследования субфоссильных коллекций археологического памятника Витебск, Верхний замок, датируемого XIII–XVI вв., определены 18 видов рыб, относящихся к 5 семействам.

Основными в коллекции субфоссильных остатков рыб археологического памятника были рыбец (27,0 % от общего числа субфоссильных остатков), лещ (22,5 %) и елец (11,8 %). Меньшую долю (от 8,6 до 3,7 %) в коллекции составили плотва, щука, жерех и синец. Доля таких видов, как густера, голавль и окунь речной, составила менее 3,0 %, но более 1 %, доля остальных видов рыб (кумжа, красноперка, судак, язь, линь, ерш обыкновенный, осетр атлантический и сом) – 1 % и меньше.

На сегодняшний день на территории Беларуси в бассейне р. Западная Двина встречаются все диагностированные нами виды рыб, не встречаются только осетр атлантический и кумжа, а рыбец представлен туводной формой.

Рыболовный промысел древние жители вели как в русле реки, так и в окружающих Витебск озерах, хотя высокая доля проходных рыб и рыб реофилов (53,1 %) указывает на более развитый речной промысел.

Анализ возраста рыб из уловов XIII–XVI и XX – начала XXI в. показал следующее. В древности промысловая нагрузка приходилась на более старшие возрастные группы: рыбец – 6 лет, лещ – 9 и 10, елец – 5 лет. В отличие от древнего промысла, современные уловы рыб в бассейне р. Западная Двина базировались в основном на младших возрастных группах рыб: рыбец – 5 лет, лещ – 3, елец – 2 года.

Автор публикации выражает благодарность Э. А. Лешкевич, Л. В. Колединскому и Н. П. Александрович за сбор и предоставление археоихтиологического материала, а также за данные по определению ряда видов рыб и их размеров по остеологическому субфоссильному материалу.

Список использованной литературы

1. Лебедев, В. Д. Пресноводная четвертичная ихтиофауна Европейской части СССР / В. Д. Лебедев. – М.: Изд-во МГУ, 1960. – 402 с.
2. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб (преимущественно пресноводных) / И. Ф. Правдин. – М.: Пищевая промышленность, 1966. – С. 163–191.

3. Сапунов, А. П. Река Западная Двина / А. П. Сапунов. – Витебскъ: Типо-Литографія Г. А. Малкина, 1893. – С. 242–243.
4. Ляшкевіч, Э. А. Прамысловыя рыбы гарадзішча Маскавічы (Браслаўскія азёры) / Э. А. Ляшкевіч, А. В. Зубей // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1999. – № 4. – С. 101–104.
5. Зубей, А. В. Распространение атлантического осетра *Acipenser sturio* L. и черноморской севрюги *Acipenser stellatus* Pallas на территории Беларуси в позднем голоцене // Тез. докл. зоол. науч. конф. – Минск, 2001. – С. 120–121.
6. Красная книга Республики Беларусь. Животные: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды диких животных / редкол.: И. М. Качановский (предс.), М. Е. Никифоров, В. И. Парфенов [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. энцыкл. імя П. Броўкі, 2015. – 320 с.
7. Жуков, П. И. Рыбы Белоруссии / П. И. Жуков. – Минск: Наука и техника, 1965. – 415 с.

Поступила в редакцию 21.03.2016

УДК 597.585.1:591.53(476)

Е. В. ВИНЦЕК, А. П. ГРИГОРЧИК

**ВОЗРАСТНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПИЩЕВОГО РАЦИОНА БЫЧКА-ПЕСОЧНИКА
NEOGOBIOUS FLUVIATILIS (PALLAS, 1814) В РЕКЕ ДНЕПР (БЕЛАРУСЬ)**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: zemlianka_8@mail.ru, imbris.09@mail.ru*

Бычок-песочник (*Neogobius fluviatilis*) является одним из чужеродных видов рыб на территории Беларуси. В работе приведены результаты изучения пищевого спектра данного вида-вселенца. Исследован состав рациона и выявлены закономерности изменения спектра питания разных возрастных групп бычка-песочника в летний период (август) в р. Днепр. Установлено, что основу рациона всех возрастных групп песочника составляют личинки сем. Chironomidae. Наибольшим разнообразием отличается спектр питания четырех- и пятилеток песочника, главным образом за счет потребления моллюсков.

Ключевые слова: чужеродные виды рыб, река Днепр, бычок-песочник, возрастная изменчивость, питание рыб, пищевой спектр.

E. V. VINTSEK, A. P. HRYHORCHYK

**AGE VARIABILITY IN THE DIET OF MONKEY GOBY *NEOGOBIOUS FLUVIATILIS* (PALLAS, 1814)
IN THE DNIEPER RIVER (REPUBLIC OF BELARUS)**

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: zemlianka_8@mail.ru, imbris.09@mail.ru*

The monkey goby (*Neogobius fluviatilis*) is one of the alien species of fish in Belarussia. The food spectrum and age variability in the diet of the monkey goby from the lower part of the Dnieper River in Bragin region were researched (August 2015). Dominant position in the diet of all age groups of this goby is among chironomid larvae. The food spectrum of the monkey goby in age 3+ and 4+ is the most various, mainly due to consumption of mollusks.

Keywords: alien species of fish, the Dnieper River, monkey goby, age variability, diet of fish, the food spectrum.

Введение. На протяжении последнего столетия отмечается устойчивый рост числа чужеродных видов рыб в составе фауны Беларуси [1]. В первую очередь это обусловлено географическим положением, так как по территории нашей страны проходит водораздел между бассейнами Черного и Балтийского морей. К антропогенным факторам, способствующим распространению чужеродных видов рыб, относятся: соединение вод разных речных систем каналами, развитие речного транспорта, гидростроительство и пр. Кроме того, большую роль в расширении ареалов видов-вселенцев играет изменение климата.

Чужеродным видом рыб для территории Беларуси является бычок-песочник (*Neogobius fluviatilis*), понто-каспийский представитель сем. Gobiidae. Данный вид одним из первых среди черноморско-каспийских бычков начал свое распространение вверх по р. Днепр.

На территории Беларуси (в реках Днепр и Сож) бычок-песочник впервые отмечен в 1936 г. [2]. В водотоках бассейна Балтийского моря данный вид был обнаружен в 1998 г. [3]. В настоящее время бычок-песочник в пределах Беларуси отмечен в реках Припять, Пина, Сож, Березина и Свислочь (бассейн Черного моря), в Днепроовско-Бугском канале, а также в реках Мухавец, Виляя и в Вилейском водохранилище (бассейн Балтийского моря).

Биологические инвазии в последнее время относят к одной из глобальных эколого-социальных проблем, что обусловлено широким спектром негативных эффектов, вызываемых видами-

вселенцами. Согласно оценке потенциальной инвазивности чужеродных видов рыб (FISK), бычок-песочник несет умеренный риск негативного воздействия, главным образом на аквакультуру и рыболовство [1].

Одним из актуальных вопросов является изучение питания данного вида, что позволит оценить его трофические взаимоотношения с аборигенной ихтиофауной, а следовательно, и степень воздействия на природные экосистемы.

Цель настоящей работы – изучение состава рациона бычка-песочника, обитающего в реках Беларуси.

Материалы и методы исследования. В данной работе приведен анализ материала, собранного на нижнем участке р. Днепр на территории Брагинского района в августе 2015 г.

Отлов осуществлялся мелкочейным неводом (длина 30 м, размер ячеи 8–10 мм) и сачком (ячея 8 мм) на глубине 0,2–1,5 м. Собранный материал фиксировали 4 %-ным раствором формалина. Обработку материала проводили в лабораторных условиях по методике И. Ф. Правдина [4]: измеряли длину (до конца чешуйчатого покрова), массу тела (целой рыбы и потрошеной), определяли пол и возраст. После этого изымали желудок и фиксировали отдельно в 4 %-ном формалине.

Для изучения питания бычка-песочника было отобрано 42 экз. (табл. 1), которые были разделены на три возрастные группы: двухлетки (1+), трехлетки (2+) и четырех- и пятилетки (3+ и 4+).

Т а б л и ц а 1. Размерно-весовые показатели исследованных экземпляров бычка-песочника разных возрастных групп (р. Днепр, Брагинский район, август 2015 г.)

Возрастная группа	К-во экз.	Длина рыбы, мм		Масса рыбы, г	
		lim	M ± SD	lim	M ± SD
1+	15	46,6–65,7	53,3 ± 6,9	1,44–4,70	2,30 ± 1,09
2+	15	59,5–93,6	68,9 ± 10,5	2,76–13,04	5,35 ± 2,89
3+ и 4+	12	78,2–92,6	83,9 ± 4,2	7,06–12,58	9,22 ± 1,75

П р и м е ч а н и е. lim – минимальное и максимальное значения параметра, M ± SD – среднее значение параметра ± стандартное отклонение.

Содержимое желудков исследовали согласно методическому пособию по изучению питания рыб в естественных условиях [4]. Отмечали количество пищевых объектов и частоту их встречаемости.

Степень наполнения пищеварительного тракта оценивали по шкале Лебедева: 0 – пустой желудок, 1 – единичное наполнение, 2 – малое наполнение, 3 – среднее наполнение, 4 – полный желудок, 5 – растянутый желудок.

Коэффициент упитанности (оценка энергетических ресурсов организма) рассчитывали по формуле Кларка

$$k = \frac{w}{l^3} \cdot 100,$$

где w – вес потрошеной рыбы, г; l – длина рыбы до конца чешуйчатого покрова, см.

Пищевая стратегия продемонстрирована с помощью графического метода Костелло [6]. Для этого данные из таблицы о составе пищи изучаемого вида, где отмечается доля определенной группы кормовых объектов в рационе (изобилие) и их встречаемость в пищевых комках исследуемой выборки рыб, переносятся в виде точек на график (рис. 1). Расположение точек вдоль диагонали «пищевая стратегия» говорит о разнообразии пищевого спектра, так как все кормовые объекты играют важную роль в рационе вида из-за их высокого обилия у малого количества особей или малого обилия, но высокой частоты встречаемости в пищевых комках. Если точки расположены вдоль диагонали «значение кормового объекта», то рацион не отличается разнообразием и в нем наблюдается резкое доминирование определенной группы кормовых объектов.

Степень сходства состава пищи («объем конкуренции») оценивали по методу, предложенному А. А. Шорыгиным [5]. Для этого брали выраженный в процентах состав пищи рыб разных возрастных групп и отмечали организмы, общие для каждой группы. Сумма меньших процен-

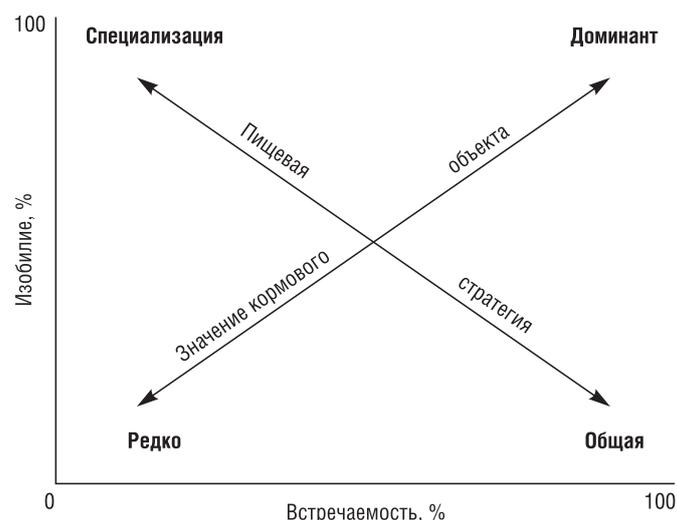


Рис. 1. Графический метод Кослелло, используемый для демонстрации пищевой стратегии рыб

тов, независимо от того, в составе пищи какой из возрастных групп встречается кормовой объект, дает степень сходства пищи.

Результаты и их обсуждение. По результатам изучения пищевых комков особей бычка-песочника разных возрастных групп выявлены некоторые закономерности. Например, отмечалось увеличение коэффициента упитанности (на 11 % у четырехлеток по сравнению с двухлетками), что говорит о благоприятных условиях нагула на территории вселения (табл. 2). Средняя наполненность желудка (по шкале Лебедева) также закономерно увеличивалась с возрастом – от 3,0 (у двухлеток) до 3,7 (у четырехлеток).

Т а б л и ц а 2. Характеристика исследованных экземпляров бычка-песочника разных возрастных групп (р. Днепр, Брагинский район, август 2015 г.)

Показатель	Возрастная группа		
	1+	2+	3+ и 4+
Наполненность желудка, балл	3,0	3,2	3,7
Коэффициент упитанности (по Кларку)	1,25	1,34	1,40
Доля пустых желудков, %	0	6,7	16,7
Соотношение самцы/самки в исследованной выборке, %	60/40	53/47	100/0

Кормовые объекты, выделенные из пищевых комков исследованных особей бычка-песочника, были разделены на 9 групп (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Состав пищи и частота встречаемости разных групп кормовых объектов в питании бычка-песочника разных возрастных групп (р. Днепр, Брагинский район, август 2015 г.), %

Кормовые объекты		1+		2+		3+ и 4+		
		Обилие	Встречаемость	Обилие	Встречаемость	Обилие	Встречаемость	
Класс Bivalvia		–	–	–	–	1,7	10	
Класс Gastropoda		–	–	4,2	7,1	24,2	80	
Класс Crustacea	Отр. Cyclopoida	–	–	4,2	7,1	–	–	
	Отр. Amphipoda	1,3	13,3	3,7	35,7	3,3	20	
	Отр. Isopoda	2,0	13,3	–	–	–	–	
Класс Insecta	Отр. Odonata	0,7	6,7	–	–	–	–	
	Отр. Diptera	Сем. Chironomidae	96,0	100	92,1	100	69,2	80
		Другие	–	–	–	–	0,8	10
	Отр. Coleoptera	–	–	–	–	0,8	10	

П р и м е ч а н и е. Обилие – доля определенной группы кормовых объектов в рационе (%), встречаемость – частота встречаемости данной группы кормовых объектов в пищевых комках исследованной выборки рыб (%).

По результатам нашего исследования в рационе двухлеток (1+) бычка-песочника из р. Днепр доминируют личинки сем. Chironomidae (96,0 % от общего количества экземпляров пищевых объектов), изредка встречались ракообразные: *Asellus aquaticus* (2 %) и представители сем. Gammaridae (1,3 %).

В рационе трехлеток бычка-песочника обнаружено 4 типа кормовых объектов. Доминирующее положение также занимают личинки сем. Chironomidae (92,1 %). Встречались ракообразные отр. Cyclozoidea (4,2 %) и сем. Gammaridae (3,7 %). В рационе появились брюхоногие моллюски (4,2 %), представленные *Bithynia tentaculata*.

Пищевой спектр бычка-песочника возраста 3+ и 4+ наиболее разнообразен и представлен 6 группами кормовых объектов. Наиболее часто встречались личинки сем. Chironomidae (69,2 %), но в этой возрастной группе они уже не являются абсолютными доминантами в рационе. Значительную долю в рационе стали занимать моллюски (25,9 %), среди которых *Bithynia tentaculata* (24,2 %) и *Pisidium* sp. (1,7 %). Встречались представители сем. Gammaridae (3,3 %). Остальные пищевые объекты в рационе песочника возраста 3+ и 4+ составили 4,9 %.

Доля рыб с пустым желудком составила в среднем 7 %, при анализе пищевого спектра данные особи не учитывались. В пищевом комке некоторых экземпляров бычка-песочника кроме кормовых объектов были найдены наземные насекомые (видимо, случайно оказавшиеся в воде), нитчатые водоросли, песок и детрит.

Результаты наших исследований показали, что состав рациона бычка-песочника возраста 3+ и 4+ более разнообразен и менее специфичен по сравнению с таковым у других возрастных групп, что продемонстрировано с помощью графического метода Костелло (рис. 2).

Анализ степени сходства состава пищи не показал достоверных различий в рационе бычка-песочника разных возрастных групп (табл. 4). Уровень конкуренции варьировался от 71 %

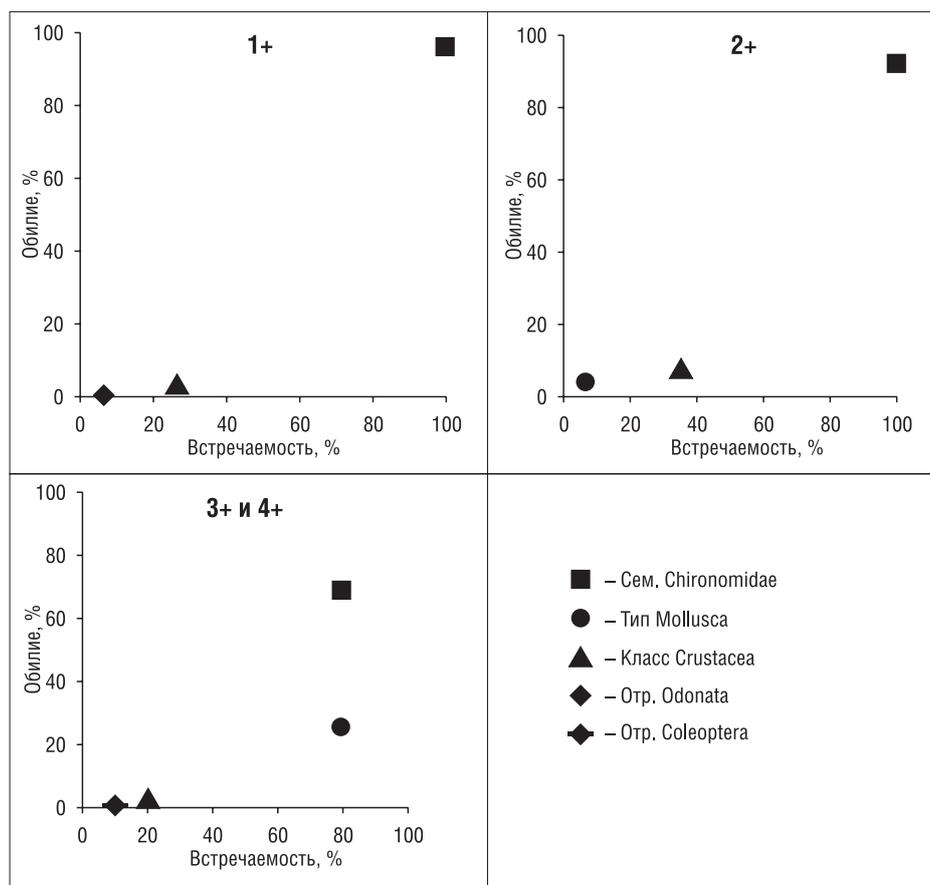


Рис. 2. Пищевая стратегия бычка-песочника разных возрастных групп, продемонстрированная с помощью графического метода Костелло (р. Днепр, Брагинский район, август 2015 г.)

(между двух- и четырехлетками) до 93 % (между двух- и трехлетками). Это обусловлено высокой значимостью в рационе всех возрастных групп бычка-песочника личинок сем. Chironomidae (от 96 до 69 % от общего количества экземпляров пищевых объектов).

Т а б л и ц а 4. Индексы сходства (по Шорыгину) пищевых компонентов бычка-песочника разных возрастных групп (р. Днепр, Брагинский район, август 2014 г.), %

Возраст		1+	2+
Возраст	2+	93	–
	3+	71	77

Выводы

1. Бычок-песочник (*Neogobius fluviatilis*) успешно адаптировался к новым условиям обитания, проявляя пищевую пластичность, которая наблюдается в разнообразии пищевого спектра (выявлено 9 групп кормовых объектов).

2. В рационе всех возрастных групп бычка-песочника из р. Днепр в августе доминировали личинки сем. Chironomidae, доля которых варьировалась от 96 до 69 % (от общего количества экземпляров пищевых объектов), а встречаемость в пищевом комке – от 80 до 100 %.

3. Состав рациона четырех- и пятилеток песочника наиболее разнообразен и менее специфичен по сравнению с таковым у других возрастных групп. Это обусловлено высокой значимостью (25,9 %) и встречаемостью (80 %) моллюсков в пищевом комке особей возраста 3+ и 4+.

4. Бычок-песочник в пищевом отношении может создавать конкуренцию аборигенным бентосоядным видам рыб, что требует дальнейшего изучения.

Список использованной литературы

1. Non-native fishes of Belarus: diversity, distribution, and risk classification using the Fish Invasiveness Screening Kit (FISK) / S. E. Mastitsky [et al.] // Aquatic Invasions. – 2010. – Vol. 5, N 1. – P. 103–114.
2. Воронцов, Е. М. Состав ихтиофауны водоемов Западной области и БССР и характеристика ихтиофауны Верхнеднепровского бассейна / Е. М. Воронцов // Фауна и экология. – Смоленск, 1937. – Вып. 3. – С. 59–86.
3. Гулюгин, С. Ю. Новые данные по расширению ареала бычков рода *Neogobius*: песочника *N. fluviatilis*, кругляка *N. melanostomus*, гонца *N. gymnotrachelus* / С. Ю. Гулюгин, Д. Ф. Куницкий // Тез. докл. Междунар. науч.-техн. конф., посвящ. 40-летию пребывания КГТУ на Калининград. земле и 85-летию высшего рыбохозяйств. образования в России, 17–19 нояб. 1998 г. – Калининград, 1999. – Ч. 1. – С. 5.
4. Правдин, И. Ф. Руководство по изучению рыб / И. Ф. Правдин. – М., 1966. – 372 с.
5. Методическое пособие по изучению питания и пищевых отношений рыб в естественных условиях. – М., 1974. – 254 с.
6. Costello, J. Predator feeding strategy and prey importance: a new graphical analysis / J. Costello // Fish Biol. – 1990. – N 36. – P. 261–263.

Поступила в редакцию 21.03.2016

УДК 598.3/4-591.543.43:591.563

Н. В. КАРЛИОНОВА, Е. А. ЛУЧИК

ВЛИЯНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФЕНОЛОГИЮ ВЕСЕННЕЙ МИГРАЦИИ И ГНЕЗДОВАНИЯ ЧИБИСА (*VANELLUS VANELLUS*) НА ЮГЕ БЕЛАРУСИ

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: rayjenna@mail.ru*

В представленной работе показаны механизмы воздействия таких климатических факторов, как индекс Северо-Атлантического Колебания и температура, на сроки, продолжительность и темпы весенней миграции и гнездования модельного вида куликов – чибиса (*Vanellus vanellus*) на юге Беларуси. Выявлены долговременные тенденции в изменении сроков прилета и гнездования в зависимости от ранней, нормальной или поздней весны.

Ключевые слова: пойменный луг, кулики, фенология гнездования, весенняя миграция, климатические факторы.

N. KARLIONOVA, E. LUCHIK

INFLUENCE OF CLIMATE FACTORS ON PHENOLOGY OF SPRING MIGRATION AND BREEDING PHENOLOGY OF LAPWING (*VANELLUS VANELLUS*) IN THE SOUTH OF BELARUS

*Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: rayjenna@mail.ru*

Over the last decades for some bird species it was registered a noticeable change in timing of spring migration in Europe toward its earlier start. In the present study we show the mechanisms of influence of climatic factors: Index of the North Atlantic Oscillation and mean temperature on the timing, duration and rate of spring migration and breeding waders in the south of Belarus. Identified long-term trends on timing of arrival and nesting lapwing *Vanellus vanellus*, according to early or normal spring.

Keywords: floodplain meadow, waders, breeding phenology, spring migration, climatic factors.

Введение. В Европе в последние десятилетия произошел заметный сдвиг сроков весенней миграции большинства видов птиц в сторону более раннего ее начала. Это связывают в первую очередь с происходящими процессами глобального потепления. Описываемый сдвиг фенологии миграции более характерен для северных широт (от 50 до 72° с. ш.), чем для южных [1–3].

Изменение климата оказывает влияние не только на различные стадии жизненного цикла куликов, но и на сроки начала миграции и ее темпы [2]. Следует отметить также, что влияние климата на сезонные явления в жизни птиц довольно широко освещено в орнитологической литературе, однако исследования, касающиеся влияния долговременных климатических изменений, сравнительно немногочисленны и в большинстве своем представлены фенологическими исследованиями воробьиных птиц и некоторых видов куликов [2, 4–6].

По результатам многолетних наблюдений миграций водно-болотных птиц на юге Беларуси, в пойме р. Припять, где проходят юго-западные границы ареалов ряда видов водно-болотных и водоплавающих птиц, нами описана и проанализирована фенология прилета куликов [2].

В ряде работ показано, что климатические условия являются важными факторами, воздействующими на численность, репродуктивные показатели (сроки и успешность гнездования), а также на продолжительность и сроки сезонных миграций куликов [2, 6–10]. Успех гнездования и выживаемость птенцов птиц напрямую зависят от сроков размножения, так как у птиц, которые размножаются в начале гнездового сезона, как правило, эти показатели гораздо выше, чем

у потомства птиц, которые размножаются в конце гнездового сезона [11, 12]. Сроки размножения куликов синхронизируются с пиками численности насекомых и коррелируют с температурой окружающей среды [10, 13].

Цель настоящей работы – выявление долговременных тенденций в изменении сроков прилета и гнездования модельного вида куликов – чибиса (*Vanellus vanellus*) в пойме р. Припять.

Материалы и методики исследования. Материалы по срокам прилета птиц собраны сотрудниками НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам (бывший Институт зоологии) и Национального парка «Припятский» с 1995 по 2015 г. в пойме р. Припять на юге Беларуси (Гомельская обл., Житковичский р-н, г. Туров, 52° 04' с. ш., 27° 44' в. д.). Пойма Припяти (единственной из крупных белорусских рек, ориентированной в широтном направлении) является одним из важнейших мест миграционных скоплений водно-болотных птиц, в том числе куликов. В 1995–1997 гг. работы проводились в марте–апреле, начиная с 1998 г. – ежегодно в течение всего периода весенней миграции. Температурные данные были получены с метеостанции «Житковичи», расположенной в 15 км к северо-востоку от стационара [14].

Для фенологии миграции и гнездования чибиса для каждого года регистрировали следующие параметры: дату первой регистрации вида (ДПР), дату откладки первого яйца (ДПЯ), а также начало и конец гнездового периода (5 и 95 % от всех кладок), основной период гнездования (25–75 % квартили) и медиану гнездования для чибиса (50 % соответственно) [2]. Значение 5 % начатых кладок вместо ДПЯ, которое определяется по единичным случаям гнездования вида, позволяет избежать систематической ошибки или влияния случайных факторов. Медиану пролета использовали вместо средней даты, так как распределение данных учетов по годам было, как правило, неравномерным или бимодальным. В настоящей работе при анализе факторов, влияющих на сроки прилета чибиса в пойме р. Припять, нами использована дата первой регистрации.

При анализе применяли зимний (декабрь–март) индекс Северо-Атлантического Колебания (САК), который взят с веб-страницы Секции анализа климата [15]. Высокие значения индекса САК зимой определяют преимущественно юго-западные ветра, повышение температуры и более раннее, чем в зимы с низким значением индекса, наступление весны. В научной литературе имеются сведения о достоверной связи индекса САК с многочисленными фенологическими явлениями в наземной и морской жизни [5, 15]. Для того чтобы избежать автокорреляции, при анализе нами использованы только два некоррелируемых климатических параметра – средние температуры февраля, марта, апреля и зимний индекс САК.

Сроки размножения у чибисов очень растянуты, так как первые кладки нередко гибнут от половодья, вымерзания, на полях в результате их распаивания или разоряются хищниками. Насиживание продолжается 24–29 дней, в плохую погоду дольше, в хорошую быстрее [7, 11]. Поэтому полевые исследования гнездования чибиса с 1999 по 2015 г. проводили с марта по июнь. Всего проанализировано 1215 гнезд чибиса. Каждое найденное гнездо помечали специальным номерным колышком, координаты его расположения фиксировали на GPS-навигаторе, отмечали ДПЯ и начало насиживания кладки [8, 16].

Для выявления трендов в сроках прилета и начала гнездования чибиса и их связи с температурным режимом нами использованы регрессионный анализ (R) и коэффициент корреляции Пирсона. Анализ проводили, используя статистический пакет StatSoft 6.0. За годы с ранней весной нами принимались годы, в которые устойчивый переход температуры через отметку в 0 °C осуществлялся ранее, чем это соответствовало климатической норме для Припятского Полесья [17].

Результаты и их обсуждение. Для чибиса характерны значительные межгодовые флуктуации в сроках прилета и гнездования в пойме р. Припять (см. таблицу). Примечательно, что величина этих флуктуаций, судя по стандартному отклонению, была сходной для различных фенологических явлений. Разница между самой ранней и самой поздней регистрацией вида за весь период исследований составила 37 дней. Из литературных и собственных данных известно, что сроки прилета большинства куликов, особенно ближних мигрантов, зависят от среднемесячных значений температур февраля и марта [2]. Так, в Норвегии фенология прилета чибиса и травника зависела от среднемесячных температур марта и апреля, однако никаких трендов

более раннего их прилета не наблюдалось [4]. Статистический анализ данных по прилету чибиса в пойму р. Припять за последние 20 лет показал достоверную связь более раннего прилета со среднемесячными температурами февраля (см. таблицу), но достоверной тенденции к более раннему прилету вида на места гнездования не выявлено [2]. Ранее нами описано, что на юге Беларуси все мигрирующие виды, кроме малого зуйка (*Charadrius dubius*), имеют отрицательную корреляцию с зимним индексом САК. Эта корреляция достоверна для четырех видов: галстучника (*Charadrius hiaticula*), золотистой ржанки (*Pluvialis apricaria*), чибиса и бекаса (*Gallinago gallinago*). Полученные нами данные по влиянию САК на сроки прилета куликов соответствуют данным, приведенным европейскими и скандинавскими исследователями, и свидетельствуют о достоверном смещении сроков начала миграции в более раннюю сторону у видов, которые относятся к ближним мигрантам [2, 3].

Тенденции в сроках прилета и гнездования чибиса *Vanellus vanellus* на юге Беларуси и их связь с сезонными температурами воздуха и индексом Северо-Атлантического Колебания (зимний САК-индекс) в 1995–2015 гг.

Фенологическое явление	К-во лет наблюдений	САК-индекс		Дата регистрации и стандартное отклонение значений				Тренд		Температура	
		r	p	Me	min	max	SD	b	R ²	r	месяц
Первая регистрация вида	20	-0,53	0,02	8.III	22.II	30.III	11,06	0,14	0,005	-0,55*	II
Откладка первого яйца	13	-0,42	0,15	5.IV	23.III	3.V	11,93	-0,48	0,04	-0,56*	IV
Начало гнездования (5 %)	13	-0,44	0,12	7.IV	24.III	8.V	11,93	-0,26	0,01	-0,63*	IV
Середина гнездования (50 %)	13	-0,58	0,04	17.IV	1.IV	15.V	12,24	-0,26	0,01	–	–

Примечание. Me – средняя дата пролета, SD – стандартное отклонение, b – коэффициент линейной регрессии ($y = a + bx$), R² – коэффициент детерминации, r – коэффициент корреляции Пирсона, * – $p < 0,05$.

Похожая картина отмечалась и в фенологии гнездования чибиса в пойме р. Припять. Сроки начала гнездования чибиса (ДПЯ и 5 % всех начатых кладок) достоверно зависят от среднемесячных значений температуры апреля. Медиана гнездования чибиса на юге Беларуси имеет отрицательную корреляцию с зимним индексом САК (см. таблицу).

Разница между ДПР и ДПЯ чибиса в пойме р. Припять в среднем составляет от 2 недель до 1,5 мес. Нами не выявлено достоверной зависимости этих значений от хода весны. Так, например, в годы с обычным ходом весны этот показатель изменялся от 46 и 35 дней в 1999 и 2013 гг. до 15 дней в 2005 и 2006 гг. Похожая ситуация отмечалась и в годы с ранней весной: 36 дней в 2008 г. и 17 дней в 2014 г. В Европе наблюдалась тенденция к сокращению временного интервала между прилетом и началом гнездования для некоторых воробьинообразных птиц [2, 3, 9, 10].

Разница между самой ранней и самой поздней ДПЯ чибиса за весь период исследований составила почти 1,5 мес. (см. таблицу). Такая большая разница во времени начала гнездования обусловлена сроками наступления весны. Так, в годы с ранней весной (2007, 2008, 2012, 2014) начало гнездования чибиса (ДПЯ) приходится в среднем на 26 марта (самая ранняя дата – 23 марта в 2007 г.), а медиана гнездования – на 5 апреля (рис. 1, 2). В то время как в годы с обычным ходом весны (2006, 2009, 2010, 2013 и 2015) средняя дата откладки первого яйца приходится на 10 апреля (самая ранняя – на 2 апреля в 2009 и 2010 гг.), а медиана гнездования в эти годы – на 23 апреля (рис. 1, 2). Таким образом, в годы с различным ходом весны сроки начала и медианы гнездования чибиса в пойме р. Припять отличаются в среднем на 10 и 17 дней соответственно (Манна–Уитни тест: $Z = 2,29, p < 0,02, n = 8,4$ и $Z = 2,46, p < 0,013, n = 8,4$ для даты начала гнездования и медианы гнездования) (рис. 2). Похожие результаты в разнице сроков гнездования чибиса в годы с разными климатическими условиями описаны и для других стран – Голландии, Швеции [12, 18].

Основной период начала кладок у чибиса в годы с ранней весной приходился на период с 28 марта по 8 апреля, в то время как в годы с обычной или поздней весной – на период с 13 апреля по 8 мая (рис. 2). Таким образом, разница в сроках начала размножения чибиса в разные годы может составлять в среднем от 2 недель до 1 мес.

Протяженность основного периода откладки яиц у чибиса в пойме р. Припять не зависит от начала гнездования, как это описано для популяции чибиса в Голландии, где птицы имели

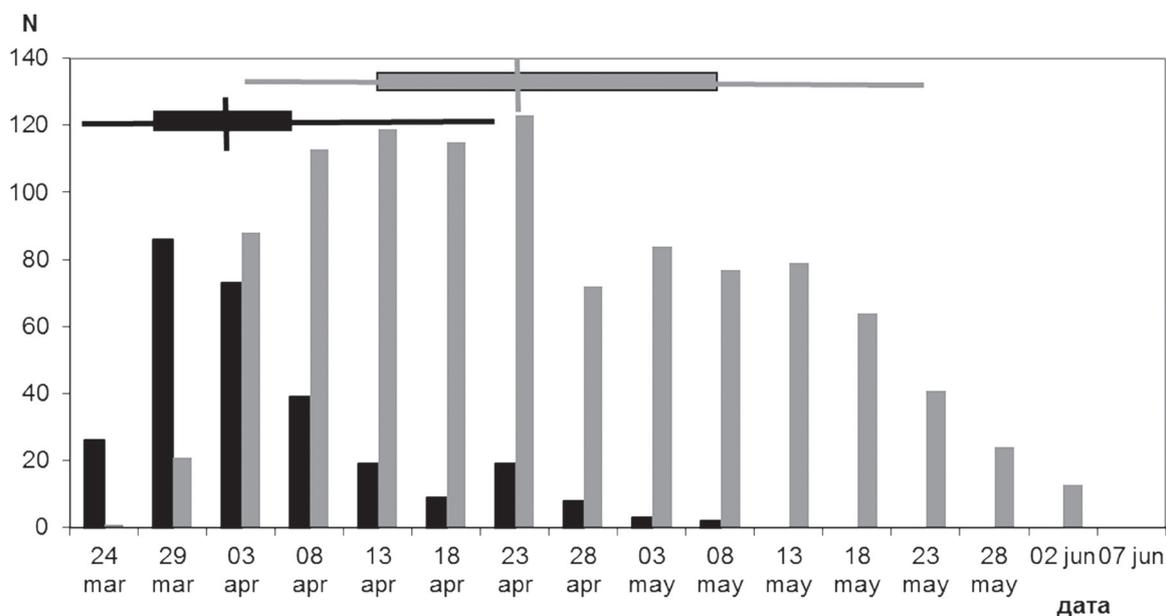


Рис. 1. Фенология гнездования чибиса *Vanellus vanellus* в пойме р. Припять на юге Беларуси в 1999–2015 гг. По оси ординат – количество начатых кладок. Черные столбцы – годы с ранней весной, серые столбцы – годы с обычным ходом весны. Горизонтальная линия – 5 и 95 % числа кладок, прямоугольник – интерквартильная величина (25–75 % кладок), вертикальная линия – средняя дата откладки яиц

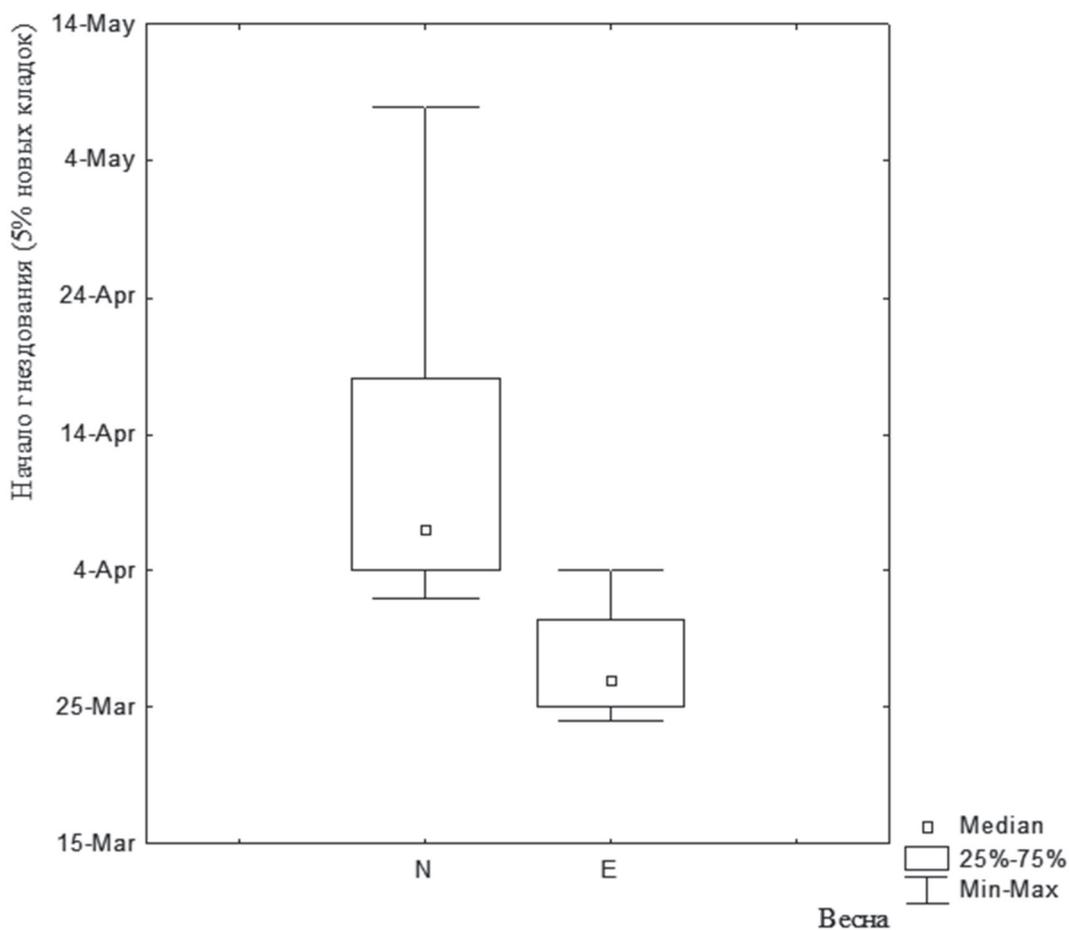


Рис. 2. Различия в сроках начала гнездования (5 % гнезд) чибиса *Vanellus vanellus* в пойме р. Припять в годы с разными условиями весны на территории Беларуси. N – обычная весна, E – ранняя весна

более короткий период гнездования в годы с поздней весной [12]. На начало и продолжительность периода гнездования чибиса в годы с обычным или поздним ходом весны на пойменных лугах Припяти влияют не столько климатические, сколько гидрологические факторы, такие как продолжительный по времени паводок, повторный паводок или его отсутствие (2008, 2013, 2015 гг.).

Анализируя изменение сроков прилета и гнездования чибиса, необходимо отметить, что по коэффициенту регрессии можно определить скорость изменения признака. Но следует принимать во внимание, что в данном случае его величина является весьма условным показателем. Сроки прилета птиц в значительной степени варьируются, а коэффициенты регрессии могут существенно изменяться при добавлении новых данных. Коэффициент детерминации (R^2) для анализируемых нами фенологических явлений невелик. Поэтому для коротких отрезков времени следует иметь в виду лишь определенную тенденцию.

Анализ литературных данных последних лет позволяет выделить две основные причины смещения сроков миграции птиц. Первая – это микроэволюционная (генетическая) реакция организма на более ранние сроки гнездования, вторая – фенотипическая пластичность мигрантов в ответ на изменение климатических условий на местах зимовок и/или на путях миграций [3]. Наиболее сильно подвержены изменениям климата ранние мигранты, которые зимуют близко от своих мест гнездования (ближние мигранты), сроки прилета которых в наибольшей степени зависят от погодных условий в местах гнездования [5]. К таким ранним мигрантам относится и чибис, однако для него не обнаружен достоверный отрицательный тренд в динамике сроков весенней миграции и гнездования.

Заключение. На юге Беларуси значительны межгодовые флуктуации в сроках прилета и гнездования чибиса. Эти флуктуации сильно зависят от распространения влияния индекса Северо-Атлантического Колебания и температурного режима весны (прилет – от температуры февраля, начало гнездования – от температуры апреля).

В отличие от других стран Европы, на юге Беларуси не выявлена тенденция более раннего прилета и гнездования чибиса. В годы с ранней весной основной период начала гнездования чибиса проходит в минимально короткие сроки – 15 дней.

Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам (бывший Институт зоологии) и Национального парка, а также студентам Гомельского и Брестского госуниверситетов. Особо хотелось бы отметить помощь коллег: П. Пинчука, Д. Журавлева, С. Мороза, В. Натыканца, А. Зятикова, И. Богдановича, Е. Слижа, А. Усова.

Список использованной литературы

1. Hurrell, J. W. Climate variability over the North Atlantic. Marine ecosystems and climate variation / J. W. Hurrell, R. R. Dickson. – Oxford: University Press, 2004. – P. 15–31.
2. Пинчук, П. В. Влияние климатических факторов на фенологию весенней миграции куликов на юге Беларуси / П. В. Пинчук, Н. В. Карлюнова // Сб. науч. тр. Азово-Черномор. орнитол. станции «Бранта». – 2011. – Вып. 14. – С. 12–26.
3. Rapid advance of spring arrival dates in long-distance migratory birds / N. Jonzén [et al.] // Science. – 2006. – Vol. 312. – P. 1959–1961.
4. Rehfishch, M. M. Predicting the impact of climatic change on Arctic-breeding waders / M. M. Rehfishch, H. Q. P. Crick // Wader Study Group Bull. – 2003. – Vol. 100. – P. 86–95.
5. Грищенко, В. Н. Изменение сроков прилета некоторых видов птиц в районе Каневского заповедника за последние 30 лет / В. Н. Грищенко // Заповедное дело Украины. – 1998. – Т. 4. – Вып. 2. – С. 49–51.
6. Beale, C. M. Wader recruitment indices suggest nesting success is temperature-dependent in Dunlin *Calidris alpina* / C. M. Beale, S. Dodd // Ibis. – 2006. – Vol. 148. – P. 405–410.
7. Hafsmo, J. E. Simultaneous tetragyny in Northern Lapwing *Vanellus vanellus* / J. E. Hafsmo, I. Byrkjedal // Bird Study. – 2001. – Vol. 48. – P. 124–125.
8. Stanevičius, V. Breeding ecology of lapwing (*Vanellus vanellus*) in flood plains of the Nemunas River delta in 2006–2007 / V. Stanevičius, M. Mačiulis // Ekologija. – 2008. – Vol. 54, N 1. – P. 10–16.
9. Dunn, P. O. Breeding Dates and Reproductive Performance / P. O. Dunn // Adv. in Ecol. Res. – 2004. – Vol. 35. – P. 67–86.
10. Dunn, P. O. Effects of climate change on timing of breeding and reproductive success in birds / P. O. Dunn, D. W. Winkler // Chapter. – 2010. – Vol. 10. – P. 113–128.
11. Wilson, A. Agri-environment schemes as a tool for reversing declining populations of grassland waders / A. Wilson, J. Vickery // Biol. conservation. – 2007. – Vol. 136. – P. 128–135.

12. Both, C. Climatic change explains much of the 20th century advance in laying date of Northern Lapwing *Vanellus vanellus* in The Netherlands / C. Both, T. Piersma // *Ardea*. – 2005. – Vol. 93 (1). – P. 79–88.
13. Pearce-Higgins, J. W. Unravelling the mechanisms linking climate change agriculture and avian population declines / J. W. Pearce-Higgins, J. A. Gill // *Ibis*. – 2010. – Vol. 152. – P. 439–442.
14. Республиканский центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения и мониторингу окружающей среды [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.pogoda.by/zip/>. – Дата доступа: 20.09.2013.
15. Hurrell Station-Based DJFM NAO Index [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://climatedataguide.ucar.edu/sites/default/files/nao_station_djfm.txt. – Дата доступа: 03.10.2015.
16. Лучик, Е. А. Особенности гнездования водно-болотных птиц заказника «Туровский луг» в 2013 году: влияние экстремальных гидрологических условий / Е. А. Лучик // *Вестн. НАН Беларуси. Сер. біял. навук.* – 2014. – N 4. – С. 103–109.
17. Природно-ресурсное обеспечение социально-экономического развития Припятского Полесья / В. С. Хомич [и др.] // *Природопользование*. – 2012. – Вып. 22. – С. 170–187.
18. Berg, Å. Population dynamics and reproduction of Northern Lapwings *Vanellus vanellus* in a meadow restoration area in central Sweden / Å. Berg, M. Jonsson, T. Lindberg // *Ibis*. – 2002. – Vol. 144. – P. 131–140.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 575.22:599.363.2

И. А. КРИЩУК, Е. С. ГАЙДУЧЕНКО, Е. Э. ХЕЙДОРОВА

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ (*SOREX ARANEUS*) НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: ikryshchuk@yandex.by

На основании проведенных кариологических исследований представлен анализ распространения хромосомных рас *Sorex araneus* на территории Беларуси. Отловленные особи принадлежат к трем расам: Białowieża (*Bi*), Nerussa (*Ne*) и Киев (*Ki*). В отличие от территорий сопредельных стран, в Беларуси популяции обыкновенной бурозубки характеризуются ярко выраженным кариотипическим полиморфизмом.

Ключевые слова: *Sorex araneus*, диагностические хромосомы, хромосомные расы, полиморфизм.

I. KRYSHCHUK, H. GAJDUCHENKO, E. KHEIDOROVA

PARTICULARITIES OF COMMON SHREW (*SOREX ARANEUS*) GENETIC DIVERSITY ON THE TERRITORY OF BELARUS

Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: ikryshchuk@yandex.by

On the basis of karyology research presents an analysis of the spread of *Sorex araneus* chromosomal races in Belarus. Caught specimens belong to three races: Białowieża (*Bi*), Nerussa (*Ne*), and Kiev (*Ki*). In contrast to the territories of contiguous countries, the populations of the common shrew of Belarus are characterized by strongly a pronounced karyotypic polymorphism.

Keywords: *Sorex araneus*, diagnostic chromosome, chromosomal races, polymorphism.

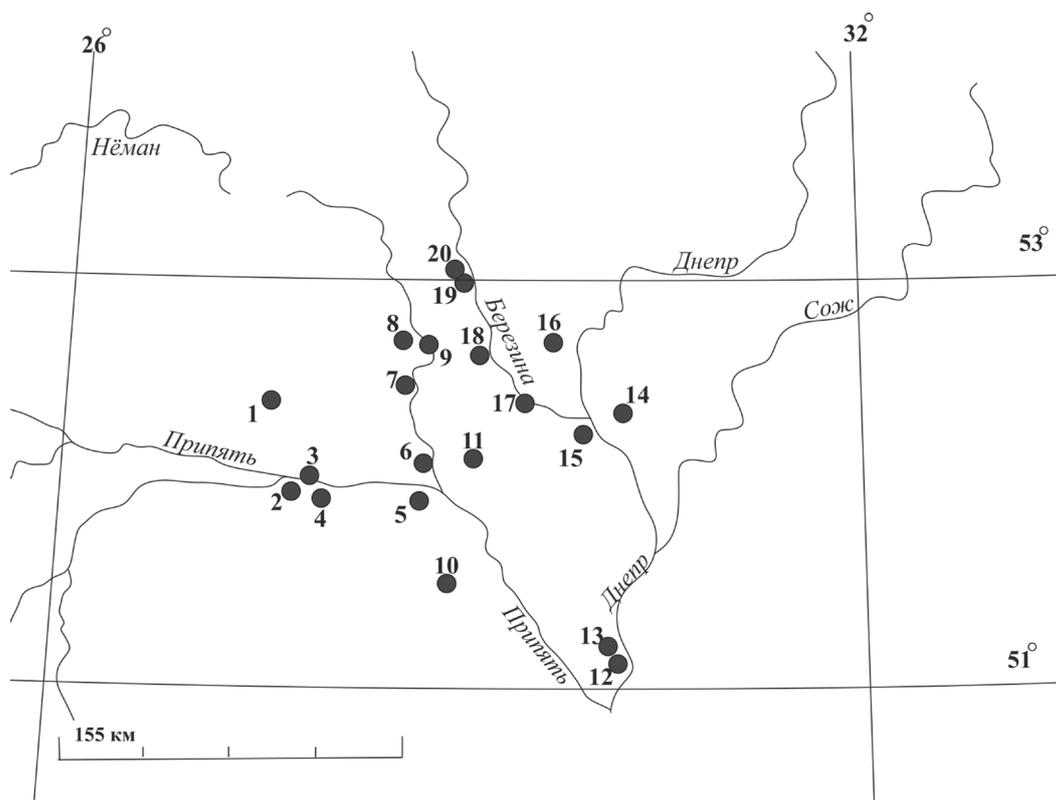
Введение. Среди млекопитающих обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) характеризуется одним из самых вариабельных кариотипов за счет частых Робертсоновских (Rb) (центрических) слияний. Для облегчения описания и унификации кариотипа каждая самостоятельная хромосома обозначается латинскими буквами в порядке алфавита, начиная с самой крупной – *a* [1]. Десять самостоятельных хромосом *g, h, i, k, m, n, o, p, q, r* и образующиеся в результате их соединения в различной последовательности метацентрические (двуплечие) хромосомы (например, *gm* или *go*) названы диагностическими [2].

В работах по цитогенетике обыкновенной бурозубки хромосомной расой называют группу географически смежных по происхождению популяций, имеющих одинаковый набор акро- и метацентрических хромосом. Название расе дает место первого описания [3]. На своем ареале от Англии до Байкала обыкновенная бурозубка образует не менее 75 хромосомных рас, сведения о которых содержатся во многих работах [4–7].

Изучение хромосомных рас обыкновенной бурозубки на конкретной территории позволяет определить их филогенетические и пространственно-временные взаимоотношения, а также проследить пути расселения данного вида в прошлом.

Материалы и методы исследования. Исследованы кариотипы обыкновенных бурозубок, отловленных в летний период (июль–август) 2012–2014 гг. в 20 пунктах на территории Беларуси в долинах рек Птичь, Припять, Днепр и Березина. Места проведения исследований указаны на рисунке.

В качестве орудия лова использовались живоловки, которые выставляли линиями по 25–30 штук в каждой на расстоянии 5 м друг от друга. В целях предупреждения гибели зверьков выставленные ловушки проверяли каждые 1,5–2 ч.



Места проведения исследований (пункты отлова указаны в таблице)

Хромосомные препараты готовили по стандартной методике из клеток костного мозга и селезенки. Хромосомы идентифицировали по рисунку G-окраски (с использованием трипсина) в соответствии с международной номенклатурой хромосом этого вида [1].

За период проведения исследований на территории Беларуси нами отловлено и изучено 174 особи обыкновенной бурозубки.

Результаты и их обсуждение. По результатам кариологического анализа установлено, что отловленные особи обыкновенной бурозубки принадлежат к трем хромосомным расам – Białowieża, Киев и Нерусса (см. таблицу).

Места находок и диагностические хромосомы обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*) на территории Беларуси

№ пункта	Пункт отлова	Хромосомная раса	2nа	Диагностические хромосомы (кариотип особи)	К-во особей
<i>Житковичский район</i>					
1	оз. Червонное				(16)
		<i>Bi</i>	24	<i>g/r, hn, i/k, m, p</i>	1
		<i>Bi</i>	24	<i>g, r, hn, ik, m, p</i>	4
		<i>Bi</i>	25	<i>g, r, hn, i/k, m, p</i>	1
		<i>Bi</i>	25	<i>g, r, h/n, ik, m, p</i>	2
		<i>Bi</i>	25	<i>g, r, h/n, i/k, m/p</i>	1
		<i>Bi</i>	26	<i>g, r, h/n, i/k, m, p</i>	5
		<i>Bi</i>	26	<i>g, r, h, n, ik, m, p</i>	1
		<i>Bi</i>	26	<i>g, r, h, n, i/k, m/p</i>	1
2	г. п. Туров				(9)
		<i>Bi</i>	24	<i>g, hn, ik, m, o, p, q, r</i>	2
		<i>Bi</i>	25	<i>g, h/n, ik, m, o, p, q, r</i>	2
		<i>Bi</i>	26	<i>g, h/n, i/k, m, o, p, q, r</i>	2
		<i>Bi</i>	26	<i>g, h, ik, m, n, o, p, q, r</i>	1
<i>Bi</i>	27	<i>g, h, i/k, m, n, o, p, q, r</i>	2		

№ пункта	Пункт отлова	Хромосомная раса	2na	Диагностические хромосомы (кариотип особи)	К-во особей
3	д. Борки				(7)
		Bi	24	g, hn, ik, m, o, p, q, r	2
		Bi	25	g, h/n, ik, m, o, p, q, r	2
		Bi	26	g, h/n, i/k, m, o, p, q, r	1
		Bi	25	g, hn, i/k, m, o, p, q, r	2
4	д. Хвоенск				(22)
		10A	28	g, h, k, i, m, n, o, p, q, r	1
		Bi	25	g/r, h/n, i/k, m, o, p, q, r	1
		Bi	25	g, hn, i/k, m, o, p, q, r	3
		Bi	25	g, h/n, ik, m, o, p, q, r	1
		Bi	26	g, h/n, i/k, m, o, p, q, r	1
		Bi	27	g, h/n, i, k, m, o, p, q, r	1
		Bi	26	g, h, i/k, k/o, m, n, p, q, r	1
		Bi	25	g, h/n, ik, m, o, p, q, r	4
		Bi	25	g, hn, i/k, m, o, p, q, r	1
		Bi	26	g, h/n, i/k, m, o, p, q, r	3
		Bi	26	g, h, ik, m, n, o, p, q, r	1
		Bi	27	g, h, n, i/k, m, o, p, q, r	3
		10A	28	g, h, i, k, m, n, o, p, q, r	1
<i>Мозырский район</i>					
5	д. Лешня				(22)
		Ki	25	g/m, hi, k, n, o, p, q, r	2
		Ki	25	g/m, h/i, k/o, n, p, q, r	1
		Ki	25	g, hi, k/o, m, n, p, q, r	1
		Ki	26	g, h/i, k/o, m, n, p, q, r	5
		Ki	26	g, hi, k, m, n, o, p, q, r	4
		Ki	27	g, h/i, k, m, n, o, p, q, r	7
		10A	28	g, h, i, k, m, n, o, p, q, r	1
Bi	27	g, h/n, i, k, m, o, p, q, r	1		
<i>Петриковский район</i>					
6	д. Конковичи				(6)
		10A	28	g, h, k, i, m, n, o, p, q, r	4
		Bi	26	g, h/n, i/k, m, o, p, q, r	2
7	д. Лучицы				(4)
		10A	28	g, h, k, i, m, n, o, p, q, r	3
		Ki	26	g/m, h/i, k, n, o, p, q, r	1
<i>Октябрьский район</i>					
8	д. Рожанов				(21)
		10A	28	g, h, k, i, m, n, o, p, q, r	7
		Bi	27	g, r, h/n, i, jl, k, m, p, o, q	1
		Bi	26	g, r, h/n, i/k, jl, m, p, o, q, r	4
		Bi	25	g, r, hn, i/k, jl, m, p, o, q	1
		Bi	25	g, h/n, ik, m, o, p, q, r	2
		Bi	27	g, h/n, i, k, m, o, p, q, r	3
		Bi	28	g, h/n, i, j/l, k, m, n, o, p, q, r	1
Bi	27	g, h, i/k, m, n, o, p, q, r	2		
9	д. Затишье				(6)
		Bi	27	g, h/n, i, k, m, p, o, q, r	1
		Bi	26	g, h/n, i/k, m, p, o, q, r	1
		Bi	27	g, h, i/k, m, n, p, o, q, r	1
		Bi	24	g, hn, ik, m, o, p, q, r	1
		Bi	27	g, h/n, i, k, m, o, p, q, r	1
Bi	26	g, hi, k, m, n, o, p, q, r	1		

№ пункта	Пункт отлова	Хромосомная раса	2па	Диагностические хромосомы (кариотип особи)	К-во особей
<i>Ельский район</i>					
10	д. Добрынь				(4)
		<i>Ki</i>	25	<i>g/m, hi, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
		<i>Ki</i>	26	<i>g, hi, k, m, n, o, p, q, r</i>	2
		<i>Ki</i>	27	<i>g, h/i, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
<i>Калинковичский район</i>					
11	окр. а. г. Озаричи				(2)
		<i>Ki</i>	26	<i>g, m, hi, k, n, o, p, q, r</i>	1
		<i>Ki</i>	26	<i>g, m, h/i, k/o, n, p, q, r</i>	1
<i>Брагинский район</i>					
12	д. Вялье				(3)
		<i>Ki</i>	26	<i>g, hi, k, m, n, o, p, q, r</i>	2
		<i>Ne</i>	24	<i>g/o, hi, k/r, m, n, p, q</i>	1
13	д. Красное				(2)
		<i>Ki</i>	25	<i>g, m, hi, k/o, n, p, q, r</i>	1
		<i>Ne</i>	24	<i>g/o, hi, kr, m/n, p, q</i>	1
<i>Речицкий район</i>					
14	д. Хотетское				(10)
		<i>Ki</i>	25	<i>g, h/i, ko, m, n, p, q, r</i>	5
		<i>Ki</i>	26	<i>g, hi, k, m, n, o, p, q, r</i>	5
15	окр. г. Речица				(18)
		<i>Ki</i>	24	<i>g, hi, ko, m, n, p, q, r</i>	2
		<i>Ki</i>	25	<i>g, hi, j/l, ko, m, n, p, q, r</i>	1
		<i>Ki</i>	25	<i>g, hi, k/o, m, n, p, q, r</i>	4
		<i>Ki</i>	25	<i>g, h/i, ko, m, n, p, q, r</i>	3
		<i>Ki</i>	26	<i>g, h/i, k/o, m, n, p, q, r</i>	3
		<i>Ki</i>	26	<i>g, hi, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
		<i>Ki</i>	27	<i>g, h/i, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
		<i>Ne</i>	25	<i>g, hi, k, m/n, o, p, q, r</i>	1
<i>Жлобинский район</i>					
16	д. Плесовичская слобода				(9)
		<i>Ki</i>	24	<i>g, hi, ko, m, n, p, q, r</i>	1
		<i>Ki</i>	26	<i>g, h/i, k/o, m, n, p, q, r</i>	2
		<i>Ki</i>	26	<i>g, hi, k, m, n, o, p, q, r</i>	2
		<i>Ki</i>	27	<i>g, h/i, k, m, n, o, p, q, r</i>	2
		<i>Ki</i>	27	<i>g, h, i, k/o, m, n, p, q, r</i>	1
		<i>IOA</i>	28	<i>g, h, i, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
<i>Светлогорский район</i>					
17	окр. г. Светлогорск				(3)
		<i>Ki</i>	28	<i>g, h/i, j/l, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
		<i>Ki</i>	27	<i>g, h/i, j/l, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
18	а. г. Паричи	<i>Ki</i>	27	<i>g, h/i, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
<i>Бобруйский район</i>					
19	д. Глебова Рудня	<i>Ki</i>	27	<i>g, h/i, k, m, n, o, p, q, r</i>	1
<i>Осиповичский район</i>					
20	д. Елизово				(9)
		<i>Bi</i>	25	<i>g, hn, i/k, m, o, p, q, r</i>	3
		<i>Bi</i>	26	<i>g, h/n, i/k, m, p, o, q, r</i>	2
		<i>Bi</i>	25	<i>g, h/n, ik, m, o, p, q, r</i>	2
		<i>Bi</i>	27	<i>g, h, i/k, m, n, o, p, q, r</i>	2

П р и м е ч а н и е. *Bi, Ki, Ne* – сокращенное международное название рас Białowieża, Киев и Нерусса соответственно. *IOA* – акроцентрическая раса. Гетерозиготность пары хромосом показана косой черточкой (/).

Как видно из таблицы, Житковичский, Октябрьский и Осиповичский районы являются территорией распространения расы Białowieża. Раса Киев занимает обширную территорию Мозырского, Ельского, Калинковичского, Речицкого, Жлобинского, Светлогорского и Бобруйского районов. Бурозубки из расы Нерусса редко попадали в отловы, их регистрировали только на территории Брагинского района и единично – в Речицком.

На указанных выше территориях среди отловленных нами бурозубок попадались особи, кариотип которых представлен 10 парами диагностических акроцентрических хромосом (кариотип 10A). Такой кариотип считается исходным в эволюции *S. araneus*, так как был выявлен только в двух изолированных эндемичных популяциях: в Западных Альпах (раса Cordon) и на Балканах (раса Pelister) [1]. Встречаемость кариотипа 10A на исследованных территориях составила: в Житковичском районе – 3,7 % (д. Хвоенск – 9,1 %), в Мозырском (д. Лешня) – 4,5, в Жлобинском (д. Плесовичская слобода) – 11,1, в Октябрьском – 25,9 % (д. Рожанов – 33,3 %). Наибольшее распространение кариотип 10A получил в Петриковском районе – 70 % (д. Конковичи – 66,7 %, д. Лучицы – 75 %). Во всех остальных районах исследований в популяциях *S. araneus* регистрировали исключительно метацентрики, сформированные 1–10 парами акроцентрических хромосом в разных комбинациях.

Проведенные нами исследования позволили установить две зоны контактов различных рас. Это Петриковский район, где контактируют расы Białowieża, Киев и широко представлен кариотип 10A (70 %), а также Брагинский район, являющийся, по-видимому, зоной контакта рас Киев и Нерусса.

Заключение. Происхождение хромосомных рас обыкновенной бурозубки на территории Беларуси можно объяснить движением потоков генов: с запада – расы Białowieża (Польша), с юга – расы Киев (Украина), с востока – расы Нерусса (Россия). При этом следует отметить, что в отличие от территорий сопредельных стран популяции бурозубок Беларуси характеризуются ярко выраженным кариотипическим полиморфизмом. Причиной неодинакового распространения и фиксации Rb транслокаций в популяциях бурозубок могут быть селективные преимущества генных комплексов, сцепленных с акро- или метацентрическим вариантом определенных хромосом [6].

Для выяснения закономерностей распространения и фиксации различных Rb транслокаций в кариотипе *S. araneus*, а также истории возникновения и путей расселения вида на территории Беларуси необходимо провести дополнительные филогеографические исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке международного белорусско-российского проекта БРФФИ (Б14Р-134).

Список использованной литературы

1. Nomenclature for the chromosomes of the common shrew (*Sorex araneus*) / J. B. Searle [et al.] // Memoires de la Societe Vaudoise des Sciences naturelles. – 1991. – Vol. 19. – P. 13–22.
2. Орлов, В. Н. О роли ледниковых эпох в формировании хромосомного полиморфизма обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia) / В. Н. Орлов, А. И. Козловский // Докл. РАН. – 2002. – Т. 386, № 3. – С. 423–426.
3. Definition and nomenclature of the chromosome races of *S. araneus* / J. Hausser [et al.] // Folia Zoologica. – 1994. – Vol. 43. – Suppl. 1. – P. 1–9.
4. Searle, J. B. Chromosomal evolution: the case of *Sorex araneus*. Survey of hybrid zones / J. B. Searle, J. M. Wojcik // Evolution of shrews / eds.: J. M. Wojcik, M. Wolsan. – Białowieża: Mammal Research Institute, 1998. – P. 243–253.
5. Хромосомная эволюция обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. в послеледниковое время на Южном Урале и в Сибири / А. В. Поляков [и др.] // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 448–455.
6. Wojcik, J. M. Evolution of the common shrew, *Sorex araneus*: chromosomal and molecular aspects / J. M. Wojcik, M. Ratkiewicz, J. B. Searle // Acta Theriologica. – 2002. – Vol. 47. – Suppl. 1. – P. 139–167.
7. Иерархия внутривидовых таксонов обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* (Insectivora), и таксономическая структура вида млекопитающих / В. Н. Орлов [и др.] // Зоол. журн. – 2004. – Т. 83, № 2. – С. 199–212.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 598.279

I. A. САЛАВЕЙ

СТРУКТУРА АСАМБЛЕІ СОЎ *STRIGIFORMES* ПРЫ ПАВЕЛІЧЭННІ АНТРАПАГЕННАЙ ТРАНСФАРМАЦЫІ ПРЫРОДНЫХ КОМПЛЕКСАЎ

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: soloveji@tut.by*

Выявлено уменьшение количества видов сов (с 9 до 3) и их совокупного обилия (в 3,3 раза), изменение видовой и размерной структур их ассамблеи по мере увеличения антропогенной трансформации природной среды от относительно естественного природного комплекса к тотальному аграрному ландшафту и рекреационно-урбанизированному пригороду. В видовой структуре ассамблеи сов установлены изменение характера доминирования (от отсутствия вида в относительно естественной Поозерской пушке до абсолютного доминирования одного вида на сильно трансформированных территориях), исчезновение редких видов, уменьшение представленности лесных видов и увеличение доли синантропных, а также разнонаправленные изменения соотношения разных видов. Все эти изменения видовой структуры происходят на фоне уменьшения совокупной плотности популяций сов и разнонаправленных изменений плотности популяций отдельных видов на территориях с разной степенью антропогенной трансформации. Также установлено, что существенно изменяется размерная структура ассамблеи сов в сторону увеличения доли мелких видов.

Ключевые слова: ассамблея сов, видовое богатство, плотность популяций, изменение структуры, антропогенная трансформация.

I. A. SOLOVEY

CHANGES IN SPECIES AND SIZE STRUCTURE ASSEMBLAGE OF OWLS *STRIGIFORMES* IN THE DIRECTION OF INCREASING ANTHROPOGENIC TRANSFORMATION NATURAL COMPLEXES

*Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: soloveji@tut.by*

With the increase of anthropogenic transformation of the natural environment from relatively natural complexes to the total agricultural and recreational-urbanized suburbs revealed a decrease in the number of owl species (from 9 to 3) and changing species composition of their assemblage. In this direction in species composition as a whole showed an increase in the dominance of its relative lack of natural Paazierre forest to the absolute domination of one species in highly transformed territories, as well as the disappearance of rare species, reducing the representation of forest species and the increase of synanthropic species, and other positive and negative changes in the proportions of different species at various stages of transformation. All these changes in species composition occur on the background of reducing the total density of populations of owls and the differently directed changes in the density of populations of species of owls in the territories of different anthropogenic transformation. It is also found that with the increase of anthropogenic transformation of the natural environment changes significantly the size structure assemblage owls in the direction of increasing the proportion of smaller species.

Keywords: assemblage of owls, species richness, changes species composition, changes size structure, anthropogenic transformation.

Уводзіны. Вядома, што совы ў параўнанні з іншымі драпежнікамі больш цяжка ставяцца да дзейнасці чалавека, таму могуць гнездавацца і выводзіць птушанят у непасрэднай блізкасці да населеных пунктаў. Узнікае пытанне, як змяняецца відавы састаў і шчыльнасць папуляцый соў у сувязі з антрапагеннымі зменамі натуральнага асяроддзя праз яго трансфармацыю ў татальны аграрны і рэкрэацыйна-ўрбанізаваны ландшафт.

Мэта даследавання – вызначыць змены відавой структуры і шчыльнасці папуляцый соў на тэрыторыях з розным узроўнем антрапагеннай трансфармацыі іглічна-дробналісцевых прыродных комплексаў.

Іглічна-дробналісцевыя прыродныя комплексы, якія займаюць паўночную палову Беларусі і з'яўляюцца пераходнымі паміж барэальнымі хваёвымі лясамі і больш паўднёвымі саснова-шырокалісцевымі, прадстаўляюць сабой мазаіку лесу, балот і шматлікіх вадацёкаў і нецякучых вадаёмаў, што разглядаецца як суцэльны тып асяроддзя для хрыбетных драпежнікаў. Аднак, на антрапагенна змененых тэрыторыях разглядаюцца ўтварэнні на месцы леса-багеннай мазаікі і адносна паўнаводных малых рэк.

Асноўнымі прычынамі антрапагеннай трансфармацыі натуральнага ландшафту ў Беларусі былі лесаэксплуатацыя, звядзенне лясоў пад нівы, пашы і паселішчы чалавека, аграрная і лясная асушальная меліярацыя балот і ўрбанізацыя. Па моцы ўплыву гэтых фактараў і накірунку павелічэння іх праяўлення абраны 5 мадэльных тэрыторый, але непасрэдна ўплыў кожнага фактара не разглядаецца. Прааналізаваны толькі структурныя змены ў асамблеі соў як вынік антрапагеннай трансфармацыі тэрыторыі.

Даследаванні праводзіліся на мадэльных тэрыторыях, дзе леса-балотная мазаіка знаходзіцца на рознай стадыі антрапагеннай трансфармацыі адносна прычын радыкальнага ўплыву. *Паазёрская пушча* – адносна натуральны прыродны комплекс у паўночнай частцы Беларусі, для якога характэрна толькі лесаэксплуатацыя (Гарадоцкі, Шумілінскі, Полацкі, Расонскі, Верхнядзвінскі р-ны). *Налібоцкая пушча*, дзе дамінуе адносна натуральнае асяроддзе, але ўжо назіраецца радыкальны ўплыў больш негатыўных прычын: лесаэксплуатацыі, аграрнай і лясной асушальнай меліярацыі балот (Іўеўскі, Валожынскі, Стаўбцоўскі р-ны). *Тонава-Хатаўская леса-аграрная тэрыторыя на ўсходнім памежжы Налібоцкай пушчы*, дзе леса-багенная мазаіка значна трансфарміравана ў асноўным для сельскагаспадарчых патрэб, але захавалася яшчэ шмат фрагментаванага лесу (каля 50 %), балоты амаль што ўсе асушаны (Валожынскі, Стаўбцоўскі р-ны). *Мірская-Карэліцкая татальная аграрная тэрыторыя на паўднёвым памежжы Налібоцкай пушчы*, дзе дамінуюць аграландшафт і паселішчы чалавека, а лясныя фрагменты складаюць каля 10 % тэрыторыі (Карэліцкі і Нясвіжскі р-ны). *Рэкрэацыйна-ўрбанізаваны ландшафт прыгараду Мінска*, які ўключае два фрагменты: адзін – трансфарміраваная тэрыторыя, дзе захаваліся невялікія ляскі і ёсць пераважна штучныя вадаёмы, і рознага кшталту забудаваныя аб'екты (далей – аграрна-збудаваны фрагмент), другі складаецца з параўнальна вялікіх лясных дзялянак, можна сказаць лясных масіваў, у якія ўкліняюцца рознага кшталту забудаваныя тэрыторыі, напрыклад лецішчы, вайсковыя часткі і інш. (далей – лясны фрагмент). Усе абраныя мадэльныя тэрыторыі ляжаць у межах дамінавання іглічна-дробналісцевых лясоў, дзе фаўна першапачаткова была прадстаўлена бадай што аднымі і тымі ж хрыбетнымі драпежнікамі ўмеранай часткі лясной зоны Еўропы.

Матэрыялы і метады даследавання. Для падлікаў соў карысталіся метадам правакацый тэрытарыяльных абаронных рэакцый пры прайграванні фанаграм галасоў соў [1, 2]. Падлікі соў праводзіліся ў сакавіку–красавіку ў перыяды іх максімальнай актыўнасці – у вячэрнія (пасля заходу сонца і да 24.00) і перадранішнія (з 3 да 5 раніцы) часы. Выключэнне састаўлялі падлікі вераб'інага сычыка *Glaucidium passerinum*, якія праводзіліся адразу пасля заходу сонца, але калі яшчэ не сцямнела (20.00–21.00). Для дакладнасці падлікаў адзін і той жа маршрут праз некаторы час праходзілі яшчэ раз. Надвор'е падчас падлікаў павінна было быць без ветру і дажджу. Акрамя таго, перад заходам сонца аглядалі тэрыторыі, дзе можна бачыць як саміх птушак, так і іх пярэці пляўкі. У дапаўненне праводзілі вышук сіпеля на фермах, у трансфарматарных будках, воданаліважных башнях і закінутых будынках.

Разлік шчыльнасці відаў вялі як на падставе маршрутных падлікаў (шырыню трансекты памнажалі на працягласць), так і пры падліках колькасці асобін на пэўнай плошчы абследавання. Потым разлічвалі колькасць асобін на 100 км². Паколькі, як паказалі ранейшыя даследаванні, ландшафты Паазер'я вельмі адрозніваюцца экалагічнай ёмістасцю ў залежнасці ад складу паверхневых адкладаў (пяскі ці гліны) [2, 3], то для карэктнай ацэнкі шчыльнасці папуляцый соў разлічвалася сярэднеўзважаная для гэтых тэрыторый: з перавагай гліністых грунтоў (Ловацкі тэрэн у Гарадоцкім раёне), пяшчаных (у Полацкім раёне) і чаргаваннем глін і пяскоў (Красны Бор у Расонскім і Верхнядзвінскім раёнах).

Пры разліку відавой структуры соў сукупная шчыльнасць усіх відаў бралася за 100 %, адносна чаго разлічвалі долю кожнага віду ў %. Відавую разнастайнасць (паказчык, які сукупна адлюстроўвае багацце відаў і іх выраўненасць) і дамінаванне ў структуры хрыбетных драпежнікаў ацэнена з дапамогай індэкса Сімпсана (IC) [4], а таксама індэкса Маргалефа (IM), выраўненасць структуры – з дапамогай індэкса Камарга (IK) [5]. Для колькаснага вызначэння дамінуючага віда(аў) соў мадэліравалі змены індэкса відавой разнастайнасці і дамінавання IC у залежнасці ад найбольшага значэння долі віду ў відаввой структуры. Пры наяўнасці 4–9 відаў найбольшы злом гэтай крывой, дзе назіралася значнае памяншэнне IC, вызначаны, калі доля віду была 35–40 %. Таму від лічылі дамінантным, калі яго доля ў відаввой структуры была 35 % і болей. Для параўнання працэнтаў карысталіся *G*-тэстам, а шчыльнасцяў папуляцый розных відаў соў – *t*-крытэрыем Ст’юдэнта (бралі сярэднегадавую шчыльнасць) [4].

Памеравую структуру разлічвалі ў % ад сукупнай шчыльнасці папуляцый відаў, якія ў залежнасці ад масы цела ўваходзяць у наступныя 4 памеравыя групы хрыбетных драпежнікаў: буйнапамеравыя (каля 20 кг і болей), сярэднепамеравыя большыя (2,5–5,0 кг), сярэднепамеравыя меншыя (0,5–2,5 кг) і дробнапамеравыя (да 0,5 кг) [2].

Ацэнку шчыльнасці папуляцый соў у Паазёрскай пушчы праводзілі ў 1996–2004 гг., у Налібоцкай пушчы – у 2000–2015 гг., на леса-аграрнай і татальнай аграрнай тэрыторыях – у 2011–2015 гг., у рэкрэацыйна-ўрбанізаваным прыгарадзе – у 2000–2014 гг.

Падчас даследавання выкарыстаны як асабістыя даныя, так і прыведзеныя ў працах [2, 6–8].

Вынікі і іх абмеркаванне. *Відаввая структура асамблеі соў і яе змены.* У адносна натуральным прыродным комплексе Паазер’я выяўлена 9 відаў соў. Гэта пугач *Bubo bubo*, шэрая кугакаўка *Strix aluco*, даўгахвостая кугакаўка *Strix uralensis*, барадатая кугакаўка *Strix nebulosa*, касматаногі сыч *Aegolius funereus*, вераб’іны сычык, вушастая сава *Asio otus*, балотная сава *Asio flammeus* і сплюшка *Otus scops*. У відаввой структуры няма дамінуючых відаў, вызначаюцца толькі субдамінантныя: вераб’іны сычык (33,7 %), даўгахвостая кугакаўка (25,4 %) і касматаногі сыч (20,7 %). Трэба адзначыць, што даўгахвостая кугакаўка жыве ў асноўным на поўначы Беларусі, а ў цэнтральнай частцы рэспублікі праходзіць паўднёвая мяжа яе арэалу, таму змены ў прадстаўленасці гэтага віду не звязаны з антрапагеннай трансфармацыяй натуральнага асяроддзя. Рэдкімі былі пугач (0,1 %), барадатая кугакаўка (0,2 %), балотная сава (0,7 %) і сплюшка (1,0 %). Відаввая структура асамблеі соў у Паазер’і характарызуецца даволі вялікім відавым багаццем, разнастайнасцю (IM = 1,6, IC = 0,76) і сярэднім узроўнем выраўненасці (IK = 0,42).

У Налібоцкай пушчы на гнездаванні таксама выяўлена 9 відаў соў, але ўжо адсутнічае сплюшка і колькасць сіпеля *Athene noctua* невялікая (0,2 %). Вельмі рэдка на міграцыях тут адзначаліся сава-бярозаўка *Surnia ulula* і белая сава *Nyctea scandiaca* (у відавым саставе не ўлічваліся). Мера разнастайнасці Макінтоша ў Налібоцкай пушчы была крыху большай, чым у Паазёрскай (84,5 і 82,8 адпаведна), бо тут такая ж колькасць відаў пры крыху большай іх сукупнай шчыльнасці. У структуры асамблеі соў вызначыліся значныя змены. Па-першае, яна стала менш разнастайнай, больш дамінантнай (IC = 0,66) і яшчэ менш выраўненай (IK = 0,32). Дамінуючае значэнне набывае шэрая кугакаўка (51,1 %), доля якой больш у 4 разы, чым у Паазёрскай пушчы ($G = 25,2, p < 0,01$). Па-другое, назіраліся рознакіраваныя змены ў прапорцыях некаторых відаў. Выяўлены як станоўчыя эфекты – значна павялічылася доля барадатай кугакаўкі (у 19 разоў; $G = 4,0, p = 0,03$), пугача (у 7 разоў; $G = 0,5, p = 0,3$) і шэрай кугакаўкі, так і адмоўныя змены – памяншэнне шчыльнасці папуляцый вераб’інага сычыка і касматаногога сыча, якія сталі займаць субдамінантнае становішча, а іх долі ў відаввой структуры асамблеі соў былі меншыя (прыкладна ў 1,5 раза; $G \leq 2,1, p \geq 0,1$), чым на адносна натуральнай тэрыторыі Паазер’я. Як бачна, пачала памяншацца прадстаўленасць дробнапамеравых лясных відаў соў. Вызначана памяншэнне долі балотнай савы (у 3,5 раза). Відаввая структура асамблеі соў у Паазёрскай і Налібоцкай пушчах адрозніваюцца ($G = 63,2, p < 0,001$).

На Тонава-Хатаўскай леса-аграрнай тэрыторыі выяўлена значна менш відаў соў – 5. Тут ужо знікаюць пугач, балотная сава, барадатая і даўгахвостая кугакаўкі. Гэта непасрэдна звязана са знікненнем ці памяншэннем прыдатнага для іх гнездавання і кормаздабывання асяроддзя, што абумоўлена высечкай лесу, асушэннем нізінных балот і выкарыстаннем гэтых тэрыторый пад

інтэнсіўныя нівы і пашы. Як і ў Паазёрскай пушчы, тут адсутнічаюць віды-дамінанты. У структуры асамблеі соў найбольшую долю ўжо маюць вушастая сава (30,2 %) і касматаногі сыч (28,0 %). Астатнія тры віды маюць падобныя прапорцыі (11,6–17,7 %). Доля шэрай кугакаўкі прыкметна меншая, чым у Налібоцкай пушчы (у 2,9 раза; $G = 16,8, p < 0,01$), і амаль адпавядае яе долі ў Паазёрскай пушчы ($G = 0,94, p = 0,51$). Таксама памяншаецца доля вераб'інага сычыка (у 2–3 разы; $G \geq 3,85, p \leq 0,05$). Выключэнне складае толькі касматаногі сыч, доля якога трохі павялічылася (у 1,5–1,9 раза, адно з двух параўнанняў статыстычна дакладнае; $G = 4,2, p = 0,03$). Доля вушастай савы на леса-аграрнай тэрыторыі ў параўнанні з гэтым паказчыкам на адносна натуральнай Паазёрскай і змененай Налібоцкай павялічваецца ў 5 разоў ($G \geq 17,9, p \leq 0,01$), а сіпеля – больш чым у 63 разы ($G \geq 15,5, p \leq 0,01$). Нягледзячы на меншую колькасць відаў, чым у Паазёрскай і Налібоцкай пушчах, індэксы відавой разнастайнасці на леса-аграрнай тэрыторыі былі амаль такімі ж, як і на менш змененых тэрыторыях ($IM = 1,67, IC = 0,77$). Гэта абумоўлена тым, што тут няма дамінуючых відаў, але няма і рэдкіх, і пры больш-менш блізкіх значэннях долей відаў і меншай іх колькасці гэта вядзе да большай выраўненасці структуры ($IK = 0,79$ супраць $IK = 0,32–0,42$). Аднак мера разнастайнасці Макінтоша была значна меншая, чым у Налібоцкай і Паазёрскай пушчах (63,5), што адэкватна адлюстроўвае змены ў відавым багацці і шчыльнасці асамблеі соў. Відавая структура асамблеі соў у Налібоцкай пушчы і на леса-аграрнай тэрыторыі адрозніваюцца ($G = 57,5, p < 0,001$).

У татальным аграрным ландшафце выяўлена ўсяго тры віды соў. Тут ужо знікаюць касматаногі сыч і вераб'іны сычык. У структуры асамблеі соў моцна дамінуе вушастая сава (62,3 %), доля якой удвая большая, чым на леса-аграрнай тэрыторыі ($G = 11,4, p < 0,01$). Долі сіпеля і шэрай кугакаўкі ў татальным аграрным ландшафце адпавядаюць іх долям на леса-аграрнай тэрыторыі ($G \leq 0,45, p \geq 0,25$), менш, чым на тэрыторыі са значна змененым натуральным асяроддзем у Налібоцкай пушчы (у 2,4 раза; $G = 12,3, p < 0,01$), і больш, чым у адносна натуральным прыродным комплексе Паазёрскай пушчы (у 1,7 раза; $G = 2,5, p = 0,1$). Адпаведна, індэксы відавой разнастайнасці і дамінавання тут самыя меншыя ($IM = 0,51, IC = 0,54$), як і мера разнастайнасці Макінтоша (34,9). Відавая структура асамблеі соў на леса-аграрнай і татальна-аграрнай тэрыторыях адрозніваюцца ($G = 56,8, p < 0,001$).

У аграрна-забудаванай частцы рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада Мінска выяўлена 4 віды соў. Як і ў татальным аграрным ландшафце, тут дамінуе вушастая сава (50,2 %). Дзякуючы наяўнасці экалагічна ёмістых фрагментаваных лясоў і шматлікіх садоў тут склаліся ўмовы для касматаногога сыча, прычым на такім жа ўзроўні, як і на леса-аграрнай тэрыторыі (25,7 %), і гэты від займае субдамінантнае становішча ў структуры асамблеі соў. Доля шэрай кугакаўкі тут меншая, чым у іншых антрапагенна трансфарміраваных тэрыторыях (у 1,6–4,5 раза, 2 з 3 параўнанняў статыстычна дакладныя; $G \geq 3,3, p \leq 0,05$), і адпавядае яе долі ў адносна натуральным прыродным комплексе Паазер'я. Відавая структура асамблеі соў у татальным аграрным ландшафце і ў аграрна-забудаванай частцы рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада адрозніваюцца ($G = 81,5, p < 0,001$).

У лясной частцы рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада Мінска выяўлена 6 відаў соў. А адбываецца гэта дзякуючы захаванасці вялікіх лясоў плошчай у дзесяткі квадратных кіламетраў і іх узросту (дамінуюць спелыя і прыспяваючыя лясы). Такія лясы гістарычна захаваліся як дзяржаўна маёмасныя запасы драўніны паблізу вялікага горада, як, напрыклад, у лясным масіве Казённы пад Мінскам, дзе праведзены даследаванні. Тут дамінуе касматаногі сыч, субдамінантамі з'яўляюцца вераб'іны сычык і шэрая кугакаўка, што нагадвае стан соў на тэрыторыях Паазёрскай і Налібоцкай пушчаў (адносна натуральны ўзровень). Але відавая структура асамблеі соў лясной часткі рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада адрозніваецца ад гэткай як у Паазёрскай ($G = 39,5, p < 0,001$) і Налібоцкай ($G = 40,5, p < 0,001$) пушчах, так і ў аграрна-забудаваным фрагменце ($G = 39,5, p < 0,001$).

Індэксы відавой разнастайнасці і дамінавання ў асамблеі соў у рэкрэацыйна-ўрбанізаваным прыгарадзе былі на прамежковым узроўні паміж адносна натуральным і татальным аграрным станам ($IM = 0,71–1,07, IC = 0,65–0,68$, мера Макінтоша = 40,8–59,0).

Відавая структура асамблей соў на ўсіх мадэльных тэрыторыях з розным узроўнем антрапагеннай трансфармацыі статыстычна дакладна адрозніваюцца ($G \geq 39,5, p \leq 0,001$).

Шчыльнасць папуляцый соў і яе змены на тэрыторыях з рознай антрапагеннай трансфармацыяй прыроднага асяроддзя. Вызначаныя адрозненні ў прапорцыях відаў соў яскрава паказалі змены ў відавой структуры гэтай асамблеі на тэрыторыях з рознай антрапагеннай трансфармацыяй натуральнага асяроддзя, але вельмі важна ведаць, наколькі шчыльна заселены совамі гэтыя тэрыторыі і ў якім накірунку змянілася шчыльнасць іх папуляцый, бо менавіта шчыльнасць з'яўляецца важным паказчыкам, які адлюстроўвае стан папуляцый. Разгледзім гэтыя змены па кожнаму віду для кожнай мадэльнай тэрыторыі.

Пачнем з відаў, якія найбольш уразлівыя да антрапагенных змен. Вызначанае памяншэнне шчыльнасці балотнай савы ў Налібоцкай пушчы ў параўнанні з Паазёрскай (у 5,5 раза) (табл. 1) непасрэдна звязана з асушэннем нізінных балот і заворваннем лугоў, інтэнсіўным выкарыстаннем гэтых земляў пад нівы і пашы, а таксама з памяншэннем наяўнасці такіх ахвяр, як карчоўнік *Arvicola terrestris*. Такія дзеянні могуць прыводзіць да скарачэння размнажэння гэтага наземна-гняздуючага віду, бо балотная сава звычайна гняздуецца ў адчыненых біятопах, а іх выбар залежыць ад наяўнасці ахвяр. Канешне, балотная сава можа засяляць сельскагаспадарчыя ўгоддзі, але толькі тыя, якія выкарыстоўваюцца не вельмі інтэнсіўна [9, 10]. Менавіта таму балотная сава цалкам знікае ў мясцовасцях з інтэнсіўным вядзеннем сельскай гаспадаркі, у нашым выпадку – ужо на леса-аграрнай тэрыторыі. Трэба дадаць, што ў выніку шматгадовага крызісу, які ахапіў усе сферы эканомікі і асабліва закрануў сельскую гаспадарку, у шмат якіх рэгіёнах зараз адсутнічае апрацоўка вялікіх плошчаў сельскагаспадарчых угоддзяў і памяншаецца выпас жывёл, у выніку чаго назіраецца тэндэнцыя павелічэння колькасці балотнай савы, але толькі да той пары, пакуль гэтыя тэрыторыі не зарастуць хмызамі і мелкалесем [10, 11].

Табліца 1. Відавы састаў асамблеі соў, шчыльнасць (асобін/100 км²) і прапорцыі (у дужках у %) іх папуляцый на мадэльных тэрыторыях з рознай антрапагеннай трансфармацыяй прыроднага асяроддзя ў 1998–2015 гг.

Від соў	Маса цела, г	Паазёрская пушча	Налібоцкая пушча	Прыродна-аграрная тэрыторыя	Рэкрэацыйна-ўрбанізаваны прыгарад		Татальная аграрная тэрыторыя
					аграрна-забудаваны фрагмент	лясны фрагмент	
<i>Bubo bubo</i>	2666	0,2 (0,1)	1,0 (0,7)	–	–	–	–
<i>Strix aluco</i>	557	21 (12,4)	74 (51,0)	23,4 (17,7)	7,8 (11,3)	17,0 (16,2)	11,1 (21,6)
<i>Strix uralensis</i>	796	43 (25,4)	0,8 (0,6)	–	–	1,3 (1,2)	–
<i>Strix nebulosa</i>	1057	0,4 (0,2)	5,5 (3,8)	–	–	–	–
<i>Aegolius funereus</i>	145	35,0 (20,7)	21,3 (14,7)	37,0 (28,0)	17,8 (25,7)	48,4 (46,1)	–
<i>Glaucidium passerinum</i>	66	57 (33,7)	33,2 (22,9)	15,3 (11,6)	–	27,9 (26,6)	–
<i>Asio otus</i>	308	9,7 (5,7)	8,6 (5,9)	40 (30,2)	34,8 (50,2)	7,6 (7,2)	32 (62,3)
<i>Athene noctua</i>	197	–	0,4 (0,3)	16,6 (12,5)	8,9 (12,8)	2,7 (2,6)	8,3 (16,1)
<i>Asio flammeus</i>	381	1,1 (0,7)	0,2 (0,2)	–	–	–	–
<i>Otus scops</i>	90	1,7 (1,0)	–	–	–	–	–
Колькасць відаў/сумарная шчыльнасць		9/169,1	9/145	5/132,3	4/69,3	6/104,9	3/51,4

Пугач, як і балотная сава, гняздуецца ў асноўным на зямлі, але, на наш погляд, знаходзіцца ў менш уразлівым стане, чым сава, з наступных нагод. Па-першае, ён мае больш ранні тэрмін пачатку гнездавання і больш шырокі рацыён харчавання, што і спрыяе больш паспяховаму размнажэнню. Па-другое, пугач з'яўляецца з'ўрытопным відам і выбар месца жыхарства больш залежыць ад наяўнасці ахвяр, чым ад наяўнасці пэўнага біятопа. Таму ва ўмовах павелічэння прыдатнага для яго ахвяр асяроддзя ў Налібоцкай пушчы (высечкі, асушэнне верхавых балот, торфараспрацоўка і другаснае забалочванне ў выніку дзейнасці баброў і інш.) шчыльнасць пугача была ў 5 разоў большая, чым у адносна натуральнай Паазёрскай пушчы. Але з далейшай больш радыкальнай трансфармацыяй тэрыторыі Беларусі ў леса-аграрным тэрэне пугач ужо знікае, як і балотная сава. Тым не менш, у культурных ландшафтах краін Заходняй Еўропы пугач змог адаптавацца да значных антрапагенных змен месцаў жыхарства, бо там працэсы інтэнсіўнага гаспадарчага асваення тэрыторыі, фарміравання светапогляду і стаўлення чалавека

да карыстання прыроднымі рэсурсамі гістарычна пачаліся значна раней, чым ва Ўсходняй Еўропе. Вядома, што не толькі трансфармацыя натуральнага асяроддзя вядзе да знікнення соў, шмат у чым гэта абумоўлена і прамым пераследам чалавека (што асабліва тычыцца пугача). Шмат у якіх краінах Заходняй Еўропы пугач з'яўляецца звычайным відам ці адзначаецца рост яго колькасці, жыве ён як на аграрнай тэрыторыі, так і на ўрбанізаванай [12–15].

Назіралася значнае і паступовае памяншэнне шчыльнасці, а потым і знікненне касматаногага сыча і вераб'інага сычыка на тэрыторыях з павелічэннем трансфармацыі прыроднага асяроддзя. Іх шчыльнасць на антрапагенна трансфарміраваных тэрыторыях у параўнанні з адносна натуральным станам у Паазёрскай пушчы была меншай у 1,6 і болей раза (7 з 8 параўнанняў статыстычна дакладныя; $t \geq 2,22$, $p \leq 0,03$). Касматаногі сыч і вераб'іны сычык адсутнічаюць у татальным аграрным ландшафце. Трэба адзначыць, што ўмовы рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада аказаліся даволі спрыяльнымі для гэтых відаў. Так, шчыльнасць касматаногага сыча ў аграрна-забудаваным прадмесці была амаль такая ж, як у Налібоцкай пушчы, а ў лясным фрагменце – большая, чым на ўсіх мадэльных тэрыторыях; узровень шчыльнасці вераб'інага сычыка, які выяўлены ў буйных лясных масівах рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада, такі ж, як у Налібоцкай пушчы. Мяркуецца, што такое зніжэнне шчыльнасці вераб'інага сычыка і касматаногага сыча абумоўлена памяншэннем рэпрадукцыі, што звязана са звыдзеннем лесу і высечкай старога дрэвастоя, бо гэтым совам дзеля размнажэння патрэбны дуплы. Фінскія даследчыкі вызначылі, што поспех гнездавання касматаногага сыча найлепшы ў спелых лясках [16, 17]. Гэта можа быць звязана і з негатывнымі стасункамі з больш буйнапамеравымі вушастай савой ці шэрай кугакаўкай, бо вядома, што больш буйныя драпежнікі часта забіваюць драбнейшых за сябе [2]. Адпаведна з гэтым у лясным фрагменце прыгарада складаюцца добрыя ўмовы для касматаногага сыча і вераб'інага сычыка. У гэтым доволі вялікім стараўзроставым лясным масіве, які фрагментаваны высечкамі, шчыльнасць буйнейшых за іх відаў соў адносна невялікая.

Рознакаіраваны ход змены шчыльнасці па меры павелічэння антрапагеннай трансфармацыі натуральнага асяроддзя назіраўся ў шэрай і барадатай кугакавак. Так, на першай прыступцы трансфармацыі прыроднага комплексу ў Налібоцкай пушчы вызначаны максімальныя значэнні шчыльнасці іх папуляцый – у 2,5 і болей раза большыя для шэрай кугакаўкі і ў 13,8 і болей раза для барадатай кугакаўкі ($t \geq 3,66$, $p \leq 0,001$). Гэтага і трэба было чакаць, бо і ў буйных лясных масівах яны выбіраюць сваю дзялянку жыхарства бліз адчыненых біятопаў – лясных палян, балот, далін малых рэк і інш., таму ва ўмовах павелічэння мазаічнасці лясоў шчыльнасць гэтых соў значна ўзрастае. Але на больш антрапагенна трансфарміраваных тэрыторыях барадатая кугакаўка не вызначана, а шчыльнасць папуляцыі шэрай кугакаўкі паступова паменшылася, дасягнуўшы на леса-аграрнай тэрыторыі такога ж стану шчыльнасці папуляцыі, як у Паазёрскай пушчы, а на татальна-аграрнай тэрыторыі і ў аграрна-забудаваным прыгарадзе стала самай малой (менш у 2–4 разы; $t \geq 2,22$, $p \leq 0,03$). У лясным прыгарадным масіве шчыльнасць шэрай кугакаўкі была толькі крыху меншая, чым у адносна натуральным прыродным комплексе Паазёрскай пушчы (у 1,2 раза). Павелічэнне шчыльнасці шэрай і барадатай кугакавак у Налібоцкай пушчы звязана са з'яўленнем сярод ляснога масіву больш экалагічна ёмістых месцаў для харчавання – зарастаючых высечак, а таксама адкрытых травяных лугоў на асушаных балотах (раней з іх было шмат верхавых) і другасных балот на месцах закінутых торфараспрацовак, а таксама ў выніку другаснага забалочвання ў сувязі з будаўнічай дзейнасцю баброў. Далейшае памяншэнне іх шчыльнасці звязана з недастатковасцю ўмоў харчавання і гнездавання з-за павелічэння колькасці інтэнсіўна выкарыстоўваемых ніў і паш (ад 5,7 % у Паазёрскай і Налібоцкай пушчах да 65,8 % у татальным аграрным ландшафце), якія мала прыдатны для гэтых лясных соў, асабліва для такой вялікай савы, як барадатая кугакаўка.

Антрапагенная трансфармацыя прыродных тэрыторый аказала станоўчы ўплыў на сінантропныя віды соў – вушастую саву і сіпеля. Шчыльнасць папуляцыі вушастай савы паступова павялічвалася з 9 асобін/100 км², як у Паазёрскай і Налібоцкай пушчах, да 40 асобін/100 км² у леса-аграрным тэрэне (павелічэнне прыкладна ў 4 разы; $t \geq 3,09$, $p \leq 0,006$), а затым трымалася амаль на тым жа ўзроўні на астатніх антрапагенна трансфарміраваных тэрыторыях, за выключэннем

ляснога фрагмента рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада, дзе яе шчыльнасць была такая ж, як у Паазёрскай і Налібоцкай пушчах (табл. 1). Амаль падобная сітуацыя вызначана і для сіпеля: яго шчыльнасць паступова павялічвалася ад 0 да 0,4 асобіны/100 км² у Паазёрскай і Налібоцкай пушчах і была большая амаль у 42 разы ў параўнанні з максімальным яе ўзроўнем на леса-аграрнай тэрыторыі. На моцна трансфарміраваных тэрыторыях татальнага аграрнага ландшафту і аграрна-забудаванага прыгарада шчыльнасць сіпеля была амаль у 2 разы меншая, чым на леса-аграрнай тэрыторыі. Прамежкавае значэнне мела шчыльнасць сіпеля ў лясным фрагменце прыгарада, дзе яна была значна большай, чым на адносна натуральных прыродных тэрыторыях (болей чым у 6,7 раза), але меншай, чым на трансфарміраваных (у 3–6 разоў).

Сукупная шчыльнасць соў паступова памяншалася (ад адной стадыі трансфармацыі да другой у 1,1–2,6 раза) па меры павелічэння антрапагеннай трансфармацыі прыроднага асяроддзя ад 169 асобін/100 км² у Паазёрскай пушчы да 51,4–69,3 асобіны/100 км² (у 2,5–3,3 раза) на моцна трансфарміраваных тэрыторыях татальнага аграрнага ландшафту і аграрна-забудаванага фрагмента рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада (табл. 1).

Памеравая структура асамблеі соў. У асамблеі соў няма ні аднаго буйнапамеравага (каля 20 кг і болей) віду. Самы буйны прадстаўнік соў еўрапейскай фаўны – пугач, які сярод таксанамічных драпежнікаў уваходзіць у групу сярэднепамеравага большых (2,5–5 кг). Паколькі пугач сустракаўся толькі ў Паазёрскай і Налібоцкай пушчах і з вельмі малой шчыльнасцю (табл. 1), то і доля сярэднепамеравага большых відаў была вельмі малой і адзначана толькі на мала трансфарміраваных тэрыторыях (табл. 2).

Табліца 2. Памеравая структура асамблеі соў, шчыльнасць (асобін/100 км²) і прапорцыі (у дужках у %) рознапамеравага груп соў на мадэльных тэрыторыях з рознай антрапагеннай трансфармацыяй прыроднага асяроддзя

Памеравая структура соў	Паазёрская пушча	Налібоцкая пушча	Прыродна-аграрная тэрыторыя	Татальная аграрная тэрыторыя	Рэкрэацыйна-ўрбанізаваны прыгарад	
					аграрна-забудаваны фрагмент	лясны фрагмент
Сярэднепамеравага большыя (2,5–5 кг)	0,2 (0,1)	1,0 (0,7)	–	–	–	–
Сярэднепамеравага меншыя (0,5–2,5 кг)	64,4 (38)	80,3 (55,3)	23,4 (17,7)	11,1 (21,6)	7,8 (11,3)	18,3 (17,4)
Дробныя (да 0,5 кг)	104,5 (61,8)	63,7 (44,0)	108,9 (82,3)	40,3 (78,4)	61,5 (88,7)	86,6 (82,6)
Сярэднеўзважаная маса соў, г	349	404	264	340	280	212

У памеравай структуры асамблеі соў аснову складаюць дробнапамеравага (да 0,5 кг) віды – 44,0–88,7 %. Але ў адносна натуральным прыродным комплексе Паазёрскай пушчы і змененым прыродным комплексе Налібоцкай пушчы іх доля была крыху меншай, чым на астатніх трансфарміраваных тэрыторыях: у 1,3–1,4 раза менш, чым у Паазёрскай пушчы (3 з 4 параўнанняў статыстычна дакладныя; $G \geq 2,97$, $p \leq 0,05$), і ў 1,8–2 раза менш, чым у Налібоцкай пушчы ($G \geq 9,87$, $p \leq 0,001$). Пры гэтым у змененым прыродным комплексе Налібоцкай пушчы доля дробнапамеравага відаў соў была самай меншай, нават менш, чым у Паазёрскай пушчы (у 1,5 раза, адрозненні, блізкія да статыстычна дакладнага; $G = 3,07$, $p = 0,059$). Адпаведна доля сярэднепамеравага меншых (0,5–2,5 кг) відаў соў была самай большай у Налібоцкай пушчы: у 1,5 раза больш, чым у Паазёрскай пушчы (адрозненні, блізкія да статыстычна дакладнага; $G = 3,27$, $p = 0,059$), і ў 2,6–4,9 раза больш, чым на астатніх трансфарміраваных тэрыторыях ($G \geq 15,35$, $p \leq 0,001$). Гэта звязана з дамінаваннем там такога сярэднепамеравага віду, як шэрая кугакаўка (51 % у відавай структуры).

Памеравая структура асамблеі соў у Паазёрскай і Налібоцкай пушчах была падобнай ($G = 1,88$, $p = 0,1$) і статыстычна дакладна адрознівалася ад аналагічнага паказчыка на астатніх, больш трансфарміраваных, тэрыторыях ($G \geq 6,99$, $p \leq 0,05$). На моцна трансфарміраваных тэрыторыях памеравая структура соў была падобнай ($G \leq 3,92$, $p \geq 0,14$).

Разлічана сярэднеўзважаная маса соў. Цалкам вызначана памяншэнне сярэднеўзважанай масы соў (у 1,3–1,7 раза) у накірунку ад адносна натуральнага стану ў Паазёрскай пушчы да рэкрэацыйна-ўрбанізаванага прыгарада Мінска (табл. 2). Пры гэтым на прамежавых стадыях назіраліся некаторыя выключэнні: у змененым прыродным комплексе Налібоцкай пушчы вызначана самая вялікая сярэднеўзважаная маса соў (больш у 1,2–1,9 раза), што тлумачыцца наяўнасцю даволі шчыльнай папуляцыі сярэднепамеравага віду – шэрай кугакаўкі.

Такім чынам, вызначана, што з павелічэннем антрапагеннай трансфармацыі прыроднага асяроддзя змяняецца памеравая структура асамблей соў у бок павелічэння колькасці дробнапамеравых відаў.

Гільды ў асамблеі соў. Совы ўваходзяць у 5 гільдый (сукупнасць відаў жывёл, якія спажываюць падобныя рэсурсы падобным чынам) з 10 наяўных у Беларусі [2]. Совы з'яўляюцца ў асноўным мюзіфагамі (спажываюць дробных грызуноў і рыёвак), але некаторыя віды ўваходзяць у іншыя гільды. Пугач акрамя стратэгіі мюзіфага рэалізуецца і як спажывец сярэднепамеравых птушак і сысуноў (зайцоў, цецеруковых птушак і інш.). У цёплым сезон шэрая кугакаўка пашырае свой рацыён за кошт спажывання жукоў і іншых насякомых, а таксама амфібіяў, рэптылій і птушак, таму лічыцца не толькі мюзіфагам, але і генералістам. Сплюшка з'яўляецца адзіным прадстаўніком з гільды спажываючых бесхрыбетных, а вераб'іны сычык – авіяфаг, спажывец у асноўным дробнапамеравых птушак.

Заклучэнне. З павелічэннем антрапагеннай трансфармацыі прыроднага асяроддзя памяншаецца відавое багацце асамблей соў (з 9 да 3 відаў) і ідзе значная перабудова відавой і памеравай структуры іх асамблей. Вызначана змена характара дамінавання пры пераходзе ад адносна натуральнага стану да стану татальнага аграрнага ландшафту і аграрна-забудаванага прыгарада. Назіраецца павелічэнне дамінавання ў відавой структуры ад яе амаль што адсутнасці ў Паазёрскай пушчы да абсалютнага дамінавання аднаго віду на моцна трансфарміраваных тэрыторыях. У асамблеі соў з павелічэннем трансфармацыі прыродных комплексаў вызначана знікненне рэдкіх, пераважна лясных, відаў і дамінаванне сінантропных.

У Паазёрскай пушчы, дзе назіраецца толькі высечка леса з лесааднаўленнем, і ў Налібоцкай пушчы, дзе мае месца падобная лесаэксплуатацыя і ў дадатак яшчэ і асушальная меліярацыя (зараз гэтыя землі з большасці закінуты, пазарасталі і падтоплены бабрамі), не складаецца адмоўных умоў для фарміравання багатай відавой структуры ў асамблеі соў. На першай прыступцы трансфармацыі ў Налібоцкай пушчы такія ж віды састаў соў, як і ў адносна натуральным прыродным комплексе Паазёрскай пушчы, але пачынае змяншацца доля лясных відаў соў (вераб'іны сычык, касматаногі сыч), якія знікаюць пры максімальнай трансфармацыі – на татальнай аграрнай тэрыторыі. Вызначаецца і часовы станоўчы эфект на мала трансфарміраванай тэрыторыі. Ён праяўляецца ў павелічэнні шчыльнасці (і долі ў відавой структуры) пугача і барадатай кугакаўкі, якія на наступнай ступені антрапагеннай трансфармацыі знікаюць (на леса-аграрнай тэрыторыі). На першай ступені трансфармацыі тэрыторыі ў Налібоцкай пушчы ўжо з'яўляюцца сінантрапныя віды соў (сіпель) ці прысутнічаюць віды, якія імкнуцца да камбінавання (адкрытых і лясных) прастораў і паселішчаў чалавека (вушастая сава). Іх колькасць істотна павялічваецца на леса-аграрнай тэрыторыі і мае максімальныя значэнні на моцна трансфарміраваных. На татальнай аграрнай тэрыторыі вызначаюцца толькі сінантропныя віды і шэрая кугакаўка, якая ў апошнія амаль 100 гадоў усё больш і больш засяляе антрапагенны ландшафт і населеныя пункты [18]. Сталая трансфармацыя асяроддзя ў татальным аграрным і аграрна-забудаваным рэкрэацыйна-ўрбанізаваным ландшафтах маюць настолькі значную фрагментацыю прыдатнага асяроддзя для большасці відаў соў, што там не складаюцца іх лакальныя папуляцыі, што вядзе да іх адсутнасці. Пры гэтым у прыгарадных, у большасці стараўзроставых, лясных масівах назіраецца даволі вялікая колькасць відаў соў, што вызначае іх значную дадатную ролю ў захаванні біялагічнай разнастайнасці.

Усе гэтыя змены відавой структуры соў адбываюцца на фоне памяншэння іх сукупнай шчыльнасці пры павелічэнні антрапагеннай трансфармацыі тэрыторыі. Вызначаны рознакіраваны ход змены шчыльнасці для розных відаў соў, але ў асноўным з тэндэнцыяй на памяншэнне для лясных відаў і на павелічэнне для сінантропных.

Вызначана змяненне памеравай структуры асамблеі соў з ростам антрапагеннай трансфармацыі прыроднага асяроддзя ў бок павелічэння долі дробнапамеравага відаў, і менавіта малапамеравыя, а не сярэднепамеравыя віды складаюць аснову гэтай асамблеі.

Выказваем падзяку В. Я. Сідаровічу, Г. А. Конч, В. В. Грычыку, Г. А. Міндліну, Р. Р. Янута за дапамогу ў правядзенні даследаванняў.

Спіс выкарыстанай літаратуры

1. *Воронецкий, В. И.* Методы изучения и охраны хищных птиц / В. И. Воронежский, А. К. Тишечкин, В. Т. Демянчик. – М., 1999. – С. 23–36.
2. *Sidorovich, V. E.* Analysis of vertebrate predator-prey community / V. E. Sidorovich. – Minsk, 2011.
3. Ландшафтная детерминированность видовой разнообразия сообществ позвоночных животных в Поозерье / В. Е. Сидорович [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2001. – № 3. – С. 82–89.
4. *Krebs, C. J.* Ecological methodology / C. J. Krebs. – California, Menlo Park, 1998.
5. *Pianka, E. R.* The structure of lizard communities / E. R. Pianka // Annual Rev. of Ecology and Systematics. – 1973. – Vol. 4. – P. 53–74.
6. *Ивановский, В. В.* Хищные птицы Белорусского Поозерья / В. В. Ивановский. – Витебск: ВГУ им. П. М. Машерова, 2012.
7. *Сідаровіч, В. Я.* Драпежныя птушкі Налібоцкай пушчы / В. Я. Сідаровіч, В. В. Грычык, І. А. Салавей // Актуальныя праблемы біоэкалогіі: матэрыялы Міждунар. науч. конф., 23–25 окт. 2014 г. – Мінск, 2014. – С. 119–120.
8. Структура асамблей і гільдый хрыбетных драпежнікаў ва ўмовах лесаэксплуатацыі і асушэння прыроднага комплексу Налібоцкай пушчы / В. Я. Сідаровіч [и др.] // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 4. – С. 75–84.
9. Response of Northern Harriers and Short-eared Owls to grassland manage / J. R. Herket [et al.] // J. Wildlife Manag. – 1999. – Vol. 63, N 2. – P. 517–523.
10. *Волков, С. В.* Пространственное и биотопическое распределение болотной совы в агроландшафте Северного Подмосквья / С. В. Волков, Т. В. Свиридова // Материалы IV конф. по хищным птицам Северной Евразии. – Пенза, 2003. – С. 280–282.
11. *Коровин, В. А.* Птицы в агроландшафтах Урала / В. А. Коровин. – Екатеринбург, 2004.
12. The state of knowledge of breeding numbers of birds of prey (Falconiformes) and owl (Strigiformes) in the Czech and Slovak Republics as of 1990 and their population trends in 1970–1990 // S. Danko [et al.] // Buteo. – 1994. – N 6. – P. 1–89.
13. *Saurola, P. L.* Monitoring Finnish Owls 1982–1996: methods and results / P. L. Saurola // Biology and conservation of owls of the Northern Hemisphere: 2nd Intern. symp. (USDA Forest Service. Gen. Tech. Rep. NC_190). – Winnipeg, 1997. – P. 363–380.
14. *Penteriani, V.* Landscape structure and food supply affect eagle owl (*Bubo bubo*) density and breeding performance: a case of intrapopulation heterogeneity / V. Penteriani, M. Gallardo, Ph. Roche // J. Zool. (Lond.). – 2002. – Vol. 257. – P. 365–372.
15. *Нанкинов, Д. Н.* Современное состояние популяций сов Болгарии / Д. Н. Нанкинов / Беркут. – 2002. – № 11 (1). – С. 48–60.
16. *Laaksoonen, T.* Lifetime reproduction of a forest dwelling owl increases with age and area of forest / T. Laaksoonen, H. Hakkarainen, E. Korpimäki // Proceed. Royal Soc. Lond. B (Suppl.). 2004. – Vol. 271. – P. 461–464.
17. Habitat composition as a determinant of reproductive success of Tengmalm's owls under fluctuating food conditions // H. Hakkarainen [et al.] // Oikos. – 2003. – Vol. 100. – P. 162–171.
18. *Пукинский, Ю. Б.* Жизнь сов / Ю. Б. Пукинский. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1977.

Паступіў у рэдакцыю 21.10.2015

УДК 631.811

А. В. ЕМЕЛЬЯНОВА

5-АМИНОЛЕВУЛИНОВАЯ КИСЛОТА КАК ИНДУКТОР НАКОПЛЕНИЯ АНТОЦИАНОВ В РАСТЕНИЯХ ОЗИМОГО РАПСА (*BRASSICA NAPUS*)

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: yashchuk.anna@mail.ru*

Установлено стимулирующее действие экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) в дозе 200 мг/л на накопление антоцианов, пролина и нековалентно связанного с белками гема в семядольных листьях 7-дневных растений озимого рапса. Отмечено ингибирующее действие экзогенной АЛК на содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов.

Ключевые слова: экзогенная 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), стимулирующее действие АЛК, озимый рапс, накопление антоцианов, фотосинтетические пигменты, гем, содержание пролина.

A. V. YEMELYANOVA

5-AMINOLEVULINIC ACID AS INDUCTOR OF ANTHOCYANIN ACCUMULATION IN PLANTS OF WINTER RAPE (*BRASSICA NAPUS*)

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: yashchuk.anna@mail.ru*

The stimulatory effect of exogenous 5-Aminolevulinic acid (200 mg/l) on the accumulation of anthocyanins, proline and non-covalently bound to proteins heme in cotyledons of 7-day-old plants of winter rape has been determined. Inhibitory effect of exogenous ALA on the content of chlorophyll *a*, *b* and carotenoids was observed.

Keywords: exogenous 5-Aminolevulinic acid (ALA), the stimulatory effect of ALA, winter rape, anthocyanin accumulation, photosynthetic pigments, heme, the content of proline.

Введение. Растения являются важным источником получения ряда соединений вторичного метаболизма, таких как эфирные масла, алкалоиды, стероиды, терпеноиды, а также антоцианы. Однако возможности получения этих соединений в достаточном количестве зачастую ограничены. На протяжении многих лет исследователи активно ведут поиск новых недорогих, доступных способов получения вторичных метаболитов и их новых источников, а также увеличения выхода этих соединений.

Антоцианы являются самой крупной группой водорастворимых пигментов в царстве растений [1]. Они содержатся практически во всех высших растениях, а также в низших растениях – водорослях, печеночниках и папоротниках. Как правило, антоцианы присутствуют в клеточном соке цветков, плодов и листьев растений, окрашивая их в красный, фиолетовый, голубой цвета и их различные сочетания, а также в стеблях, запасающих органах и корнях [2]. Синтезируются данные соединения в цитоплазме и депонируются в клеточные вакуоли при помощи глутатионовой помпы [3].

Антоцианы имеют огромное значение как для растений, так и для человека. Основная функция антоцианов в растениях – эффективная защита в стрессовых условиях. Потребность в антоцианах огромна. Они используются в фармацевтической промышленности, поскольку обладают антиоксидантными, противовоспалительными, антиконвульсивными и хемопротекторными свойствами, а кроме того, снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний и риск возникнове-

ния некоторых видов злокачественных образований [1]. Антоцианы используются также в пищевой индустрии, где они разрешены в качестве пищевых добавок.

В связи с изложенным выше представляло интерес изучить возможность применения АЛК на растениях озимого рапса (*Brassica napus*) как модельной системе с целью повышения в них содержания антоцианов, а также выявить факторы, повышающие их накопление в присутствии АЛК, и проанализировать изменение содержания в этих растениях пролина, нековалентно связанного с белками гема, и фотосинтетических пигментов.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали 4–7-дневные проростки озимого рапса. Растения выращивали в лабораторных условиях до 7-дневного возраста либо на поверхности воды, либо в растворах АЛК (100–200 мг/л). Проращивание семян (по 50 штук в каждом варианте) осуществляли в пластиковых контейнерах на фильтровальной бумаге при температуре 26 ± 2 °С и освещении, создаваемом люминесцентными лампами типа ЛБ-40 (освещенность 3000–4900 лк). Полив растений осуществляли ежедневно.

В ходе экспериментов у 4–7-дневных проростков озимого рапса, выращиваемых на воде и в растворах АЛК (100–200 мг/л), определяли содержание антоцианов (как описано в работе [5]), пролина (согласно методике [6]), основных фотосинтетических пигментов – хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов (согласно уравнениям, представленным в работе [7]), нековалентно связанного с белками гема (согласно методу, описанному в работе [8]). Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, вычисленные по результатам трех независимых экспериментов. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали стандартный пакет программы Excel 2010 [9].

Результаты и их обсуждение. В результате анализа содержания антоциановых пигментов в 7-дневных проростках озимого рапса выявлено, что растения, обработанные АЛК (100–200 мг/л), формировали семядольные листья с фиолетовой окраской и имели чрезвычайно высокое содержание антоцианов по сравнению с таковым у контрольных образцов, выращенных на поверхности воды. Возрастание освещенности от 3000 до 4900 лк также стимулировало в среднем в 2 раза накопление антоцианов в обработанных АЛК растениях.

Изучение динамики накопления антоцианов показало, что их количество в семядольных листьях контрольных растений не изменялось в течение 7 дней и в среднем составляло 94 ± 4 мкмоль/г сырой массы (рис. 1). После обработки растений экзогенной АЛК в концентрации 200 мг/л

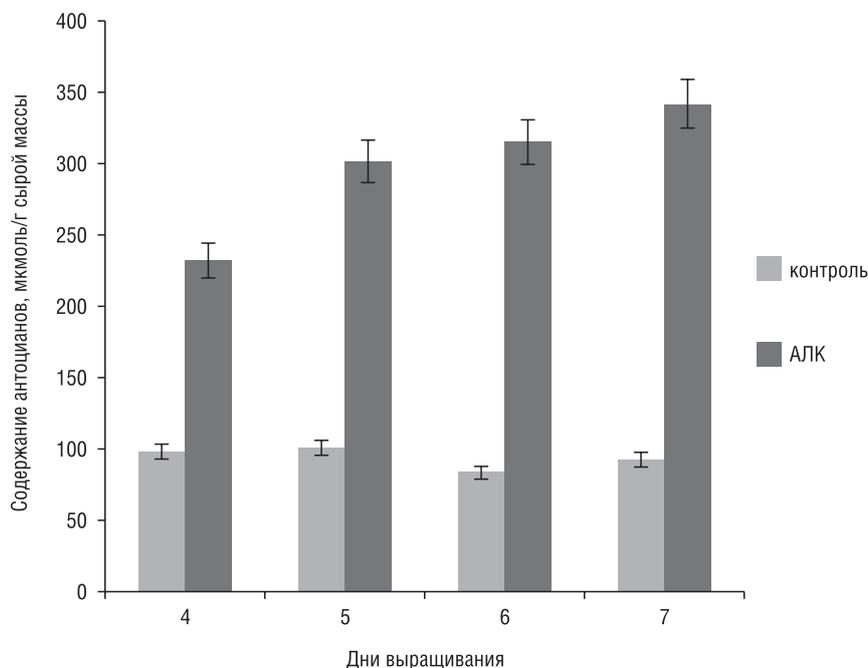


Рис. 1. Влияние экзогенной АЛК (200 мг/л) на содержание антоцианов в семядольных листьях растений озимого рапса, выращиваемых до 7-дневного возраста

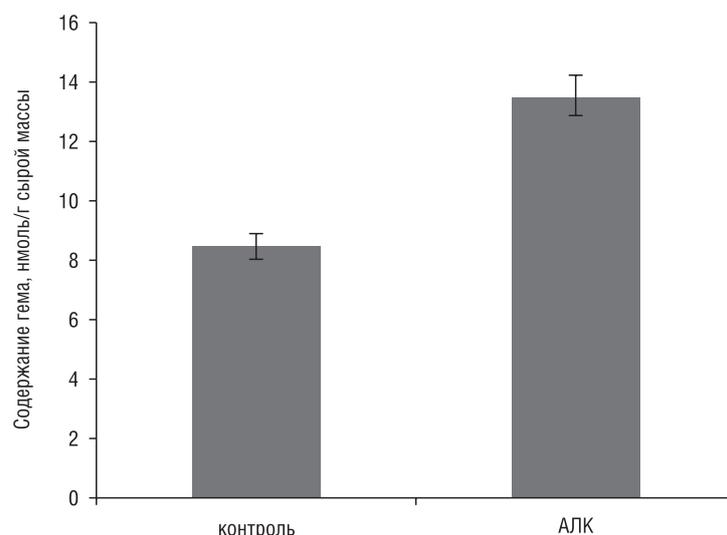


Рис. 2. Влияние экзогенной АЛК (200 мг/л) на количество нековалентно связанного с белками гема в 7-дневных проростках озимого рапса

и при освещенности 4900 лк наблюдали положительную динамику роста антоциановых пигментов по сравнению с контролем. Максимальное содержание антоцианов в обработанных растениях отмечалось на 7-й день вегетации (рис. 1). К этому периоду оно возрастало примерно в 3,5 раза по сравнению с таковым в контрольных образцах, выращенных на воде.

Поскольку АЛК является предшественником хлорофиллов и гема в биосинтезе [10], проведены опыты по определению этих пигментов в растениях озимого рапса, обработанных экзогенной АЛК. Анализ содержания основных фотосинтетических пигментов показал, что накопление хлорофиллов *a* и *b* в ходе вегетации значительно отставало от контроля (на 44 и 38 % к 4-му дню выращивания, на 37 и 27 % к 5-му дню, на 31 и 27 % к 6-му и на 24 и 21 % к 7-му дню развития), демонстрируя постепенное сокращение различий между контролем и опытом. Аналогичную картину наблюдали и в опытах с каротиноидами (см. таблицу).

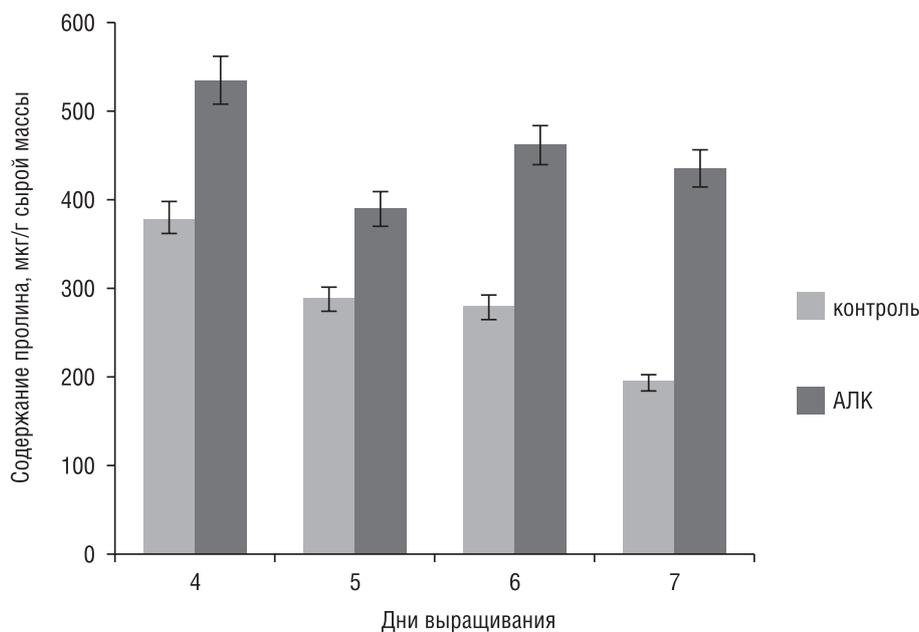


Рис. 3. Влияние экзогенной АЛК (200 мг/л) на накопление пролина в семядольных листьях растений озимого рапса, выращиваемых до 7-дневного возраста

Относительное количество Хл *a*, Хл *b* и каротиноидов в семядольных листьях озимого рапса, выращенных в растворе АЛК (200 мг/л), %

День вегетации	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	Каротиноиды
4-й	56	62	100
5-й	63	73	68
6-й	69	73	75
7-й	76	79	81

Примечание. Данные приведены в сравнении с контролем.

При определении содержания нековалентно связанного с белками гема в 7-дневных проростках озимого рапса, выращенных на поверхности воды и в растворах АЛК с концентрацией 200 мг/л, отмечалось возрастание содержания гема на 60 % по сравнению с таковым у контрольных образцов, выращенных на поверхности воды (рис. 2).

Использование высокой концентрации экзогенной АЛК (200 мг/л) способствовало протеканию в растениях фотодинамических процессов, поэтому представлялось интересным изучить накопление универсального антистрессора – пролина в растениях, обработанных экзогенной АЛК. На 4-й день вегетации содержание пролина под действием АЛК составило 141 % от контроля, на 5-й день наблюдали незначительное снижение его уровня до 136 % от контроля, на 6-й день – до 165 %, в то время как на 7-й день вегетации озимого рапса содержание пролина составило 225 % по сравнению с таковым у контрольных растений (рис. 3).

Заключение. Установлено, что у растений озимого рапса, обработанных экзогенной АЛК (200 мг/л), более высокое содержание антоцианов, чем у контрольных образцов, выращенных на поверхности воды. Отмечено стимулирующее действие света высокой интенсивности на накопление антоцианов в растениях озимого рапса, обработанных АЛК. Обнаружено ингибирующее действие высоких концентраций экзогенной АЛК на содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов. Выявлено увеличение содержания пролина и нековалентно связанного с белками гема в растениях озимого рапса, выращенных на экзогенной АЛК, по сравнению с таковым у контрольных растений. Сделан вывод, что использование АЛК является эффективной стратегией, позволяющей существенно увеличить выход антоцианов, а растения озимого рапса могут рассматриваться как перспективный источник этих соединений.

Список использованной литературы

1. Gould, K. Anthocyanins. Biosynthesis, Functions and Application / K. Gould. – New York, 2009. – P. 200–202.
2. Lila, M. L. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach / M. L. Lila // J. Biomed. Biotechnol. – 2004. – Vol. 5. – P. 306–313.
3. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2 / K. A. Marrs [et al.] // Nature. – 1995. – Vol. 375. – P. 397–400.
4. Xie, L. 5-Aminolevulinic acid promotes anthocyanin accumulation in Fuji apples / L. Xie // Plant Growth Regulation. – Vol. 69. – P. 295–303.
5. The systematic identification of flavonoids / T. J. Mabry [et al.]. – New York, 1970. – P. 261–266.
6. Rapid determination of free proline for water-stress studies / L. S. Bates [et al.] // Plant Soil. – 1973. – Vol. 39. – P. 205–207.
7. Шлык, А. А. Биохимические методы в физиологии растений / А. А. Шлык. – М., 1971. – С. 154–170.
8. Weinstein, J. D. Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis* / J. D. Weinstein // J. Biol. Chem. – 1983. – Vol. 258. – P. 6799–6807.
9. Алексейчук, Г. Н. Физиологическое качество семян сельскохозяйственных культур и методы его оценки / Г. Н. Алексейчук. – М., 2005. – 46 с.
10. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск, 2012. – С. 12–18.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 576.315.4:547.918

Ю. С. КАНАШ

АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ-ТРАНСПОРТЕРОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: jurakanash@rambler.ru*

Установлено, что при оценке экспорта конъюгатов глутатиона из эритроцитов при действии N-ацетил-L-цистеина (НАС) наблюдается незначительное увеличение активности ABCC1 и RLIP76. Последний, по-видимому, вносит определенный вклад в GSH-независимый транспорт ксенобиотиков из эритроцитов. С помощью флуоресцентного красителя кальцеина показано, что транспортная активность MRP1 в процессе детоксикации ксенобиотиков, конъюгированных с глутатионом, в малой степени зависит от пула свободного глутатиона.

Ключевые слова: белки-транспортёры ксенобиотиков, кальцеин, N-ацетилцистеин, глутатион, эритроциты человека.

J. S. KANASH

ACTIVITY PROTEIN TRANSPORTERS IN HUMAN ERYTHROCYTES UNDER N-ACETYL-L-CYSTEINE ACTION

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
e-mail: jurakanash@rambler.ru*

It was established that in assessing transport glutathione conjugates from erythrocytes by the action N-acetylcysteine there is tendency to increase activity both ABCC1 and RLIP76. The latter, apparently, seems to make a certain contribution to the GSH-independent transport of xenobiotics from the erythrocytes. Using the fluorescent dye calcein was shown that transport activity of MRP1 during detoxification of xenobiotics, conjugated with glutathione, does not depend on the pool of free glutathione.

Keywords: proteins xenobiotic transporters, calcein, N-acetylcysteine, glutathione, human erythrocytes.

Введение. Выведение глутатионовых конъюгатов является завершающей стадией защиты клетки от чужеродных веществ. Конъюгаты глутатиона с ксенобиотиками менее реакционноспособны и токсичны, чем исходные вещества, и выводятся из клеток с помощью различных транспортных систем. Ввиду отсутствия некоторых ферментов, обеспечивающих дальнейший метаболизм конъюгатов глутатиона, эритроциты человека представляют собой удобную модель для изучения особенностей процессов детоксикации ксенобиотиков из клеток крови [1, 2]. Известно, что глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин, GSH) – распространенный клеточный тиол и низкомолекулярный трипептид, в эритроцитах человека его концентрация составляет примерно 2 мМ. Он способен предотвращать окисление SH-групп и восстанавливать дисульфидные связи, инактивировать свободные радикалы и участвовать в процессах выведения ксенобиотиков из клеток [2, 3]. Одним из предшественников GSH является антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (НАС), который может достаточно быстро накапливаться в клетках и диацетилироваться. Это приводит к значительному увеличению концентрации GSH [3].

Антиоксиданты, включая НАС, наряду с цитостатиками являются модификаторами биологических реакций и используются в онкологии. Действие таких препаратов направлено как на опухолевые клетки, так и на различные регуляторные системы организма, восстановление или стимуляцию противоопухолевой резистентности, усиление антибластомной эффективности

терапии и ослабление ее токсического действия на организм. К настоящему времени существуют две различные точки зрения относительно роли мембранных белков-транспортёров в процессах выведения конъюгатов глутатиона из клеток. С одной стороны, считается, что конъюгаты глутатиона транспортируются из клеток с помощью АТФ-зависимых мембранных белков семейства ABCС (MRP) [4]. С другой стороны, некоторые исследователи связывают транспорт большинства (около 70 %) конъюгатов глутатиона с активностью динитрофенил-S-глутатион АТФазы (DNP-SG АТФазы), известной также как 76 кДа белок (RLIP76). Последний обнаружен практически во всех клетках различных организмов, в том числе в эритроцитах человека [5–8].

Ранее нами показано [9], что при действии на эритроциты человека NAC в концентрации 0,1–10 мМ в течение 60 мин выход конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (DNP-SG-конъюгатов) из клеток уменьшается в среднем на 10–20 %. Однако при более длительной инкубации эритроцитов с NAC (в течение 24 ч) в концентрации 0,1 мМ был получен противоположный эффект [10]. В работе [10] также установлено, что воздействие NAC в концентрации 5–10 мМ на эритроциты в течение 60 мин статистически значимо увеличивает выход DNP-SG-конъюгатов в среднем на 10–20 % по отношению к интактным клеткам.

Цель данной работы – выявление особенностей функционирования транспортных мембранных белков семейства MRP и RLIP76 в эритроцитах человека при действии N-ацетилцистеина *in vitro*.

Материалы и методы исследования. В работе использована периферическая кровь условно здоровых доноров, полученная из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ. В качестве консерванта использован гепарин. Выделение эритроцитов из периферической крови доноров проводили по методу [5].

О транспортной активности белков семейства MRP и RLIP76 судили по кинетике выхода конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) (DNP-SG-конъюгатов) [1]. Для этого отмытые от плазмы эритроциты ресуспензировали в буфере А (138 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 6,4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, pH 7,45), содержащем CDNB в концентрации 0,3 мМ. Суспензию эритроцитов (1 %-ный гематокрит) инкубировали в течение 40 мин при 37 °С, после чего трижды отмывали в течение 5 мин (2000 g, 4 °С). Затем проводили инкубацию клеток с NAC или HCl в течение 60 и 180 мин при 37 °С в буфере А, содержащем 5,6 мМ глюкозы, после чего собирали супернатант, осаждали его 10 %-ной трихлоруксусной кислотой и измеряли поглощение раствора при $\lambda = 340$ нм (D_{340}), по величине которого судили о степени выхода DNP-SG-конъюгатов. Следует отметить, что инкубацию эритроцитов с CDNB и NAC проводили последовательно, так как установлено, что NAC способен реагировать с 1-хлор-2,4-динитробензолом с образованием гемоглобин-цистеин-DNB-аддуктов даже в системах, не содержащих ферментов, а глутатионтрансферазы могут утилизировать наряду с GSH также NAC и γ -глутамилцистеин [3]. Концентрацию GSH определяли по методу Элмана [9].

Функциональную активность транспортного белка MRP1 определяли по остаточному удержанию флуоресцентного красителя кальцеина-АМ (CAL) [11]. Для этого суспензию интактных эритроцитов в буфере А нагружали кальцеином-АМ в течение 45 мин при 37 °С, отмывали 5 мин (2000 g, 4 °С) и ресуспензировали в исходном буфере. Затем клетки инкубировали с исследуемыми концентрациями NAC или HCl по протоколу, описанному выше, и незамедлительно проводили цитофлуориметрический анализ.

Эстеразную активность эритроцитов контролировали по интенсивности флуоресценции кальцеина-АМ, используя метод [8]. Для этого эритроциты, предварительно обработанные NAC или HCl, инкубировали в буфере А с кальцеином-АМ в конечной концентрации 1 мкМ в течение 45 мин при 37 °С и проводили цитофлуориметрический анализ на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США). Спектрометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord M40 (Германия). Различия между группами оценивали с помощью непараметрических критериев Вилкоксона и Манна–Уитни в программе Statistica v.6.0. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$. На рис. 1–3 представлены медианные значения из 4–10 независимых экспериментов.

Результаты и их обсуждение. Известно, что функциональная активность большинства транспортных белков находится в узких пределах концентрации ионов водорода (физиологические значения), соответствующей для животных клеток, pH 6,0–8,0. В работе [12] показано, что если pH внешней среды находится в нейтральном диапазоне (7,0–7,7), то цитозольный pH отличается на $\pm 0,05$. При значительных отклонениях pH инкубационной среды от физиологических значений белки могут подвергаться конформационным изменениям, приводящим к потере активности из-за денатурации или изменения зарядов их молекул. Также установлено, что изменение pH среды влияет на степень ионизации и физико-химическое состояние кислотных и основных групп в структуре транспортных белков (COOH-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина, NH₂-группы лизина и др.) [13]. Кроме того, следует отметить, что на функционирование транспортных белков оказывает влияние суммарный заряд субстратов и кофакторов (например, GSH для MRP1).

Во многих работах, посвященных исследованию различных клеточных систем *in vitro* с использованием NAC в качестве антиоксиданта, не учитывается его свойство сдвигать pH инкубационной суспензии в кислую область при добавлении в миллимолярных концентрациях [14, 15]. Нами установлено, что добавление NAC в концентрации 100 мкМ в буфер А (pH 7,45) практически не изменяет значение pH среды, в то время как NAC в концентрации 1 мМ снижает pH буфера А до $7,25 \pm 0,05$, а добавление в концентрациях 5 и 10 мМ приводит к снижению значений pH буфера А до $6,50 \pm 0,05$ и $4,00 \pm 0,05$ соответственно. С целью оценки влияния снижения pH инкубационного буфера на исследуемые транспортные процессы проведены эксперименты, в которых с помощью HCl модифицировали pH буфера А до уровня, соответствующего воздействию NAC в концентрации 1–10 мМ. Как видно из рис. 1, значимых отличий между действием NAC в концентрации 1–10 мМ и HCl в концентрациях, равноценно изменяющих pH инкубационного буфера, не установлено.

Согласно данным, полученным ранее [7], и результатам данного исследования, NAC в концентрации 0,1–5 мМ не приводит к гемолизу эритроцитов, тогда как 10 мМ антиоксиданта вызывает значительный (>50 %) гемолиз клеток. При этом эстеразная активность – маркер жизнеспособности клеток – в не подвергшихся гемолизу клетках снижается в среднем на 60 % (рис. 2). Следует также отметить, что в ряде случаев процент гемолиза был незначительным – ~10 % (данные не приведены), что, возможно, связано с индивидуальной устойчивостью эритроцитов доноров к гемолизу при закислении инкубационного буфера. Более того, установлено, что краткосрочное (1 ч) воздействие NAC в концентрации 1–10 мМ при стабилизации инкубационного буфера до физиологических значений pH не оказывает влияния (по сравнению с нативными клетками) на жизнеспособность эритроцитов. Таким образом, снижение жизнеспособности клеток при воздействии NAC в миллимолярных концентрациях (без стабилизации pH буфера) в значительной степени обусловлено сдвигом pH инкубационного буфера в кислую область. На основании изло-

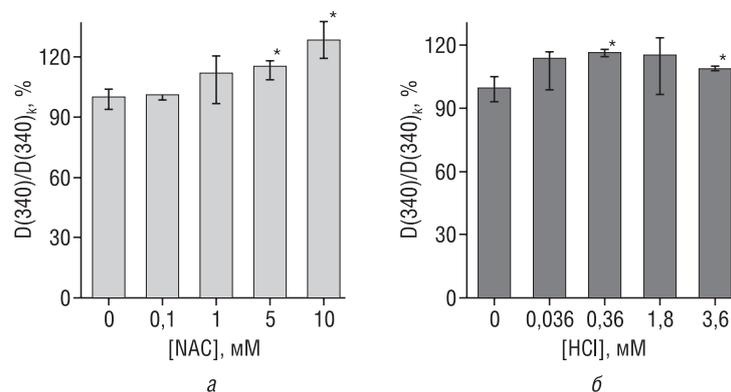


Рис. 1. Выход конъюгатов глутатиона из эритроцитов человека при действии NAC (а) и HCl (б) (HCl в используемых концентрациях снижает значение pH инкубационного буфера, как в случае воздействия NAC (0,1–10 мМ): 1 – pH 7,45; 2 – pH $7,45 \pm 0,05$; 3 – pH $7,25 \pm 0,05$; 4 – pH $6,50 \pm 0,05$; 5 – pH $4,00 \pm 0,05$. За 100 % принято оптическое поглощение образцов в отсутствие NAC или HCl (контроль). * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

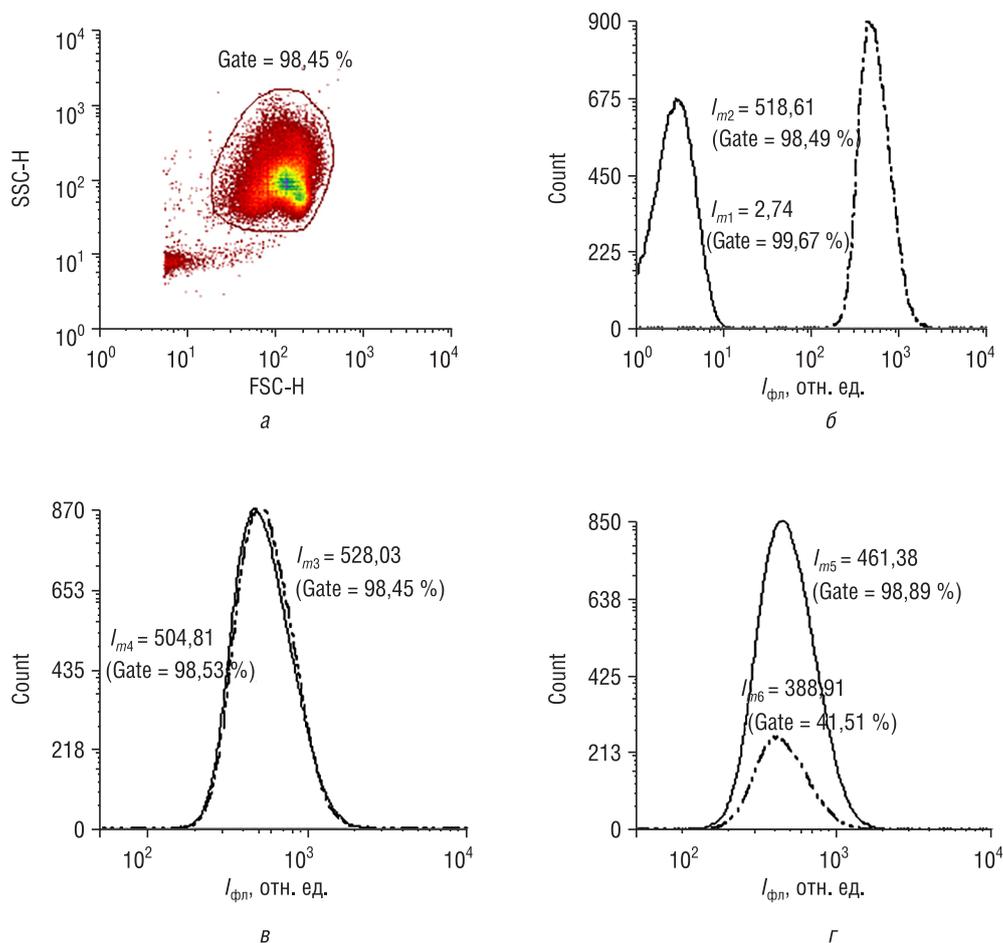


Рис. 2. Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции кальцеина ($I_{\text{фл}}$) в эритроцитах после воздействия NAC в различных концентрациях: *a* – процентное содержание жизнеспособных эритроцитов в выбранном регионе (Gate), по оси ординат представлен параметр бокового рассеяния света (SSC-H), а по оси абсцисс – прямого рассеяния света (FSC-H); *б* – значения медиан $I_{\text{фл}}$ эритроцитов до (I_{m1}) и после (I_{m2}) обработки CAL; *в* – значения медиан $I_{\text{фл}}$ CAL в эритроцитах после обработки NAC в концентрациях 0,1 мМ (I_{m3}) и 1 мМ (I_{m4}); *г* – значения медиан $I_{\text{фл}}$ CAL в эритроцитах после обработки NAC в концентрациях 5 мМ (I_{m5}) и 10 мМ (I_{m6}). В скобках представлено процентное содержание жизнеспособных эритроцитов в выбранном регионе

женного выше можно заключить, что для изучения транспортных процессов в эритроцитах при действии NAC целесообразно использовать концентрации данного антиоксиданта от 0,1 до 1 мМ, которые сдвигают pH в сторону окислителей не более чем на 0,2.

Ранее показано, что для выведения DNP-SG-конъюгатов из клетки с участием MRP1 необходимо наличие определенного пула свободного глутатиона и АТФ [4], а для функционирования RLIP76 достаточно только присутствия АТФ [5, 6]. Однако установлено, что применение CDNB в концентрации 1 мМ в течение 15 мин приводит к снижению уровня внутриклеточного GSH более чем на 70 % [2, 3], при этом последующее воздействие NAC в концентрации 5 мМ в течение 3 ч на истощенные по глутатиону эритроциты позволяет практически полностью восстановить его пул [2]. Также известно, что NAC способствует выходу конъюгатов глутатиона после истощения последнего с помощью CDNB, а в ситуации нарушения редокс-баланса эритроциты могут задействовать GSH-независимый механизм детоксикации, что позволяет утилизировать низкомолекулярные тиол-содержащие соединения [3]. На основании этого можно предположить, что основная роль в выведении ксенобиотиков из клетки в таком случае может принадлежать белкам, активность которых не зависит от концентрации GSH.

Для уточнения этого предположения проведены исследования по оценке остаточного удержания флуоресцентного красителя кальцеина, за выброс которого из клеток отвечает преимущественно MRP1 белок [5]. Из рис. 3, *a* видно, что статистически достоверное снижение интенсивности

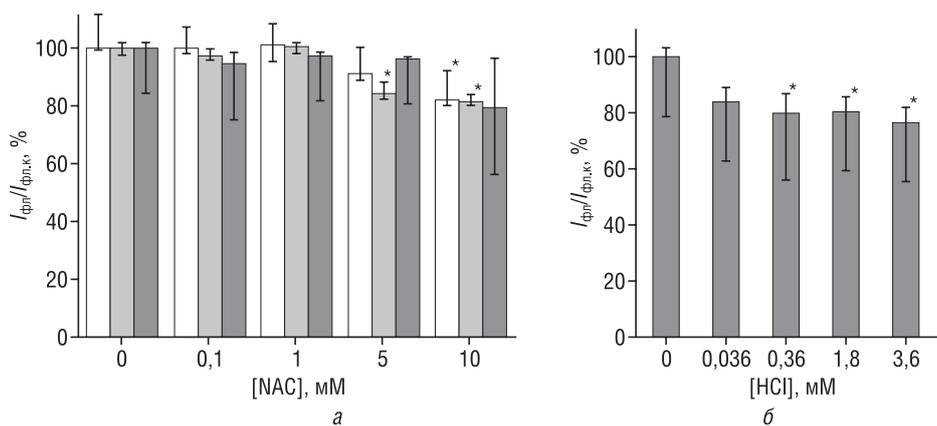


Рис. 3. Остаточное удержание кальцеина в эритроцитах при воздействии NAC (а) и HCl (б): а – – NAC; – последовательное воздействие CDNB (0,1 мМ) и NAC в концентрации 0,1–10 мМ; – одновременное воздействие NAC и NaOH; б – влияние HCl в используемых концентрациях на снижение значения pH инкубационного буфера до уровня, соответствующего воздействию NAC (0,1–10 мМ): 1 – pH 7,45; 2 – pH 7,45 ± 0,05; 3 – pH 7,25 ± 0,05; 4 – pH 6,50 ± 0,05; 5 – pH 4,00 ± 0,05. За 100 % принято значение интенсивности флуоресценции CAL ($I_{\text{фл.к}}$) в эритроцитах в отсутствие NAC или HCl (контроль). * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

флуоресценции CAL на 10–20 % в эритроцитах наблюдалось только при действии NAC в концентрациях 5 и 10 мМ, что свидетельствует о возрастании транспортной активности белка MRP1.

Также было оценено остаточное удержание кальцеина в эритроцитах после предварительного истощения пула глутатиона посредством CDNB, но статистически значимых различий по сравнению с клетками, проинкубированными только с NAC в течение 1 ч, выявить не удалось (рис. 3, а). Это косвенно подтверждает предположение о том, что действие белка MRP1 не зависит от пула свободного глутатиона, а присоединение последнего вызывает конформационные изменения белка лишь посредством увеличения сродства к определенному роду субстратов.

Кроме того, не установлено достоверных отличий между действием NAC и HCl (рис. 3). Это подтверждают расчеты коэффициента ранговой корреляции для двух групп данных ($R_s = 0,705$; $p = 0,0007$; $n = 10$). Так, если для представленных выше данных по влиянию NAC в концентрации 0,1–10 мМ на остаточное удержание кальцеина в качестве контроля взять соответствующие по pH величины интенсивности флуоресценции кальцеина, то получим, что снижение активности транспортера в большой степени обусловлено снижением pH инкубационной среды. В то же время скомпенсированные по pH с помощью NaOH результаты (рис. 3, а) говорят о незначительном снижении остаточного удержания кальцеина (порядка 10 %) при действии NAC в концентрации 10 мМ.

Следует отметить, что при увеличении времени инкубации эритроцитов с NAC в концентрациях 0,1 и 1 мМ до 3 ч остаточное удержание кальцеина также снижалось в среднем на 10 % (см. таблицу), но, в отличие от 1-часовой инкубации с NAC, при 3-часовом воздействии установлены статистически достоверные отличия при действии NAC в концентрации 1 мМ.

Выход конъюгатов глутатиона с CDNB, уровень GSH и остаточное удержание кальцеина в эритроцитах, подвергшихся 3-часовому воздействию NAC

[NAC], мМ	DNP-SG-конъюгаты, %	[GSH], %	CAL, %
0	100,00 (2,19; 12,93)	100,00 (1,71; 1,71)	100,00 (8,43; 0,89)
0,1	100,38 (3,64; 3,43)	102,56 (0,83; 0,83)	100,90 (6,50; 6,94)
1	107,56 (0,49; 17,84)	109,40 (1,56; 1,56)	91,38 (4,71; 1,41)*

* Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Заключение. Установлено, что при использовании NAC в концентрациях свыше 1 мМ необходимо учитывать его способность к закислению инкубационной среды. Более того, эффекты миллимолярных концентраций NAC на изменение транспортных процессов мембранопосредованных

белков MRP1 и RLIP76 в большинстве случаев вызваны именно снижением рН. Воздействие НАС в концентрациях 0,1; 1 и 5 мМ не оказывает эффекта на активность внутриклеточных эстераз эритроцитов человека, тогда как присутствие данного антиоксиданта в инкубационной среде в концентрации 10 мМ снижает число жизнеспособных клеток более чем в 2 раза. Показано, что MRP1-опосредованный транспорт ксенобиотиков, конъюгированных с GSH, слабо зависит от концентрации последнего в клетках.

Список использованной литературы

1. Direct measurement of the rate of glutathione synthesis in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene treated human erythrocytes / J. E. Raftos [et al.] // *Redox. Rep.* – 2006. – Vol. 11, N 1. – P. 9–14.
2. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes / J. Raftos [et al.] // *Int. J. Bio. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39, N 9. – P. 1698–1706.
3. Yildiz, D. Comparison of N-acetyl-L-cysteine and L-cysteine in respect to their transmembrane fluxes / D. Yildiz, I. Kuran // *Turk. J. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 34. – P. 233–238.
4. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1/ S. P. Cole [et al.] // *Trends Pharma. Sci.* – 2006. – Vol. 27, N 8. – P. 438–446.
5. RLIP76: a novel glutathione-conjugate and multi-drug transporter / S. Singhal [et al.] // *Biochem. Pharma.* – 2009. – Vol. 77, N 5. – P. 761–769.
6. RLIP76 is the major ATP-dependent transporter of glutathione-conjugates and doxorubicin in human erythrocytes / R. Sharma [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol. 391, N 2. – P. 171–179.
7. Канаши, Ю. С. Определение жизнеспособности эритроцитов человека с помощью флуоресцентного красителя кальцеина-АМ при действии N-ацетилцистеина / Ю. С. Канаши, А. В. Тамашевский // Сб. ст. XI съезда БООФИБ. – Минск, 2014. – Т. 2. – С. 179–181.
8. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging / D. Bratosin [et al.] // *Cytometry A.* – 2005. – Vol. 66, N 1. – P. 78–84.
9. Канаши, Ю. С. Влияние антиоксидантов на активность глутатион-S-трансфераз и транспорт конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека / Ю. С. Канаши // *Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2009. – № 4. – С. 128–132.
10. Канаши, Ю. С. Влияние низкомолекулярных антиоксидантов на структурно-функциональное состояние динитрофенил-S-глутатион АТФазы в эритроцитах человека / Ю. С. Канаши, А. В. Тамашевский, Н. В. Гончарова // Сб. ст. X съезда БООФИБ. – Минск, 2012. – Т. 1. – С. 36–38.
11. Detection of MRP functional activity: calcein AM but not BCECF AM as a Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) substrate / D. P. Olson [et al.] // *Cytometry.* – 2001. – Vol. 46. – P. 105–113.
12. Determination of the intracellular pH of intact erythrocytes by ¹H NMR spectroscopy / D. L. Rabenstein [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 121, N 2. – P. 423–432.
13. Glaser, R. Does the Transmembrane Potential ($\Delta\psi$) or the Intracellular pH (pH_i) Control the Shape of Human Erythrocytes? / R. Glaser // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75, N 1. – P. 569–570.
14. Effect of COPD treatments on MRP1-mediated transport in bronchial epithelial cells / Deen M. Vander [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. 469–475.
15. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine / I. Akan [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2005. – Vol. 5, N 1. – P. 22–31.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 581.1.035.3:631.589:577.152.1

Е. Н. КАРАСЕВА, Т. Г. ЯНЧЕВСКАЯ

АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ У *DIOSCOREA ALATA* L.

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: ledymc_net@mail.ru*

С помощью электрофоретических исследований изучены активность и число молекулярных форм пероксидазы для нового растения диоскореи, выращиваемого в искусственных условиях на модифицированных субстратах ТРИОНА® с помощью различных гидрогелей, с целью выявления факторов его стрессоустойчивости. Установлено, что пероксидазы листьев *Dioscorea alata* L. представляют собой чувствительный сенсор на изменение влажности корнеобитаемой среды, регулируемой с помощью гидрогелей.

Ключевые слова: пероксидаза, гидрогель, ионообменный субстрат, стрессоустойчивость, *Dioscorea alata* L.

E. N. KARASEVA, T. G. YANCHEVSKAYA

ACTIVITY PEROXIDASES AS AN INDICATOR STRESS HAVE *DIOSCOREA ALATA* L.

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: ledymc_net@mail.ru*

The are studies examined activity and number of molecular forms of peroxidase for the new plants cultivated *Dioscorea alata* L. on modified substrates TRIONA ® using different hydrogels in artificial conditions in order to identify stress factors by using the electrophoretic. It was found the peroxidase to leaves of *Dioscorea alata* L. represent sensitive sensor to change humidity root environment, regulated by using the hydrogels.

Keywords: peroxidase, hydrogel, ion exchange substrate, stress, *Dioscorea alata* L.

Введение. Значительную роль в ответных реакциях растений на условия окружающей среды оказывают окислительно-восстановительные процессы, в частности реакции, протекающие с участием кислородных радикалов. Образование активных форм кислорода (АФК), таких как синглетный кислород (O_2^*), супероксид-радикал (O_2^-), гидроксил-радикал (OH^-) и перекись водорода (H_2O_2), называемое окислительным взрывом, является одним из ранних ответов на внешнее воздействие [1]. В клетках, как системах жизнеобеспечения растения в целом, поддерживается динамическое равновесие между образованием активных форм кислорода и их детоксикацией, которое осуществляется с помощью многокомпонентной системы антиоксидантной защиты, состоящей из низкомолекулярных (флавоноиды, стероиды, гликозиды, хиноны, пероксидаза) и высокомолекулярных (супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза) компонентов. Одним из них является пероксидаза, способная реагировать на широкий спектр факторов, приводящих к нарушению гомеостаза АФК у растений.

Под влиянием внешних факторов у пероксидаз могут изменяться активность и число изоформ. К настоящему времени установлено, что стресс-протекторное действие некоторых биологически активных веществ может проявляться в их способности уменьшать активность пероксидазы и количество ее изоформ.

В связи с этим с помощью электрофоретических исследований нами изучено действие различных модификаций гидрогелей в ассоциации с биологически активными веществами на активность и число молекулярных форм пероксидазы с целью выявления факторов стрессоустойчивости

к изменению водного баланса ионообменного субстрата ТРИОНА® для нового растения диоскореи, выращиваемого в искусственных условиях [2].

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили растения диоскореи (*Dioscorea alata* L.). Их выбор обусловлен ценными хозяйственными, фармакологическими свойствами и декоративным экзотическим видом. Черенки *Dioscorea alata* L. укореняли на Биотехнических комплексах, установленных в закрытом помещении с искусственным освещением, на которых размещали пластиковые контейнеры размером 20×20 см² с вариантами модифицированного субстрата, в которых размещали черенки с густотой посадки по 5 шт. В качестве светового источника использовали натриевые ДНАТ-400, люминесцентные ЛБ-40 лампы, температуру поддерживали на уровне 20 ± 2 °С днем и 17 ± 2 °С ночью [3].

Модификацию субстрата проводили путем внесения определенных концентраций различных гидрогелей марки ЕСОФЛОС А-07 (КНР) в следующих вариантах: гидрогель с бентонитом 43К (вариант 1), гуматом 13К (вариант 2), калием 03К (вариант 3), гидрогель без удобрений мелкой и крупной фракций (варианты 4 и 5 соответственно), применяя описанные в работе [4] методы. Гель вносили в субстрат ТРИОНА® в набухшем состоянии в концентрациях 1,0 и 0,5 г/л [4–6]. Для определения изоферментов пероксидаз и ферментативной активности применяли методику, приведенную в [7–10].

Результаты и их обсуждение. Согласно полученным данным (рис. 1, 2, табл. 1), пероксидазный комплекс анионных пероксидаз *Dioscorea alata* L. имеет следующий компонентный состав изоферментов: минорные с Rf 0,039; 0,043; 0,064; 0,74; 0,31; 0,177; 0,5 (минорными называются компоненты, в которых интенсивность окраски находится на пределе разрешения метода) и мажорные с Rf 0,36; 0,63; 0,54; 0,72; 0,82 (мажорными считаются компоненты, интенсивность окраски которых по бензидину является максимальной для данного метода определения). Как видно из полученных данных (рис. 1, 2, табл. 1), практически все используемые гидрогели оказывают свое влияние на активность и изоферментный спектр пероксидаз. На рис. 1, 2 видны существенные различия в степени окраски пероксидазы (пропорционально ее активности) в зависимости от концентрации гидрогелей. Контрольный вариант представлен двумя основными изоформами Rf = 0,65 и Rf = 0,72. При добавлении в среду бентонита с концентрацией 0,5 г/л наблюдаются изменения в содержании изоформы пероксидазы с Rf = 0,65. Дальнейшее увеличение концентрации гидрогеля с бентонитом до 1 г/л приводит к увеличению активности изоформы с Rf = 0,65

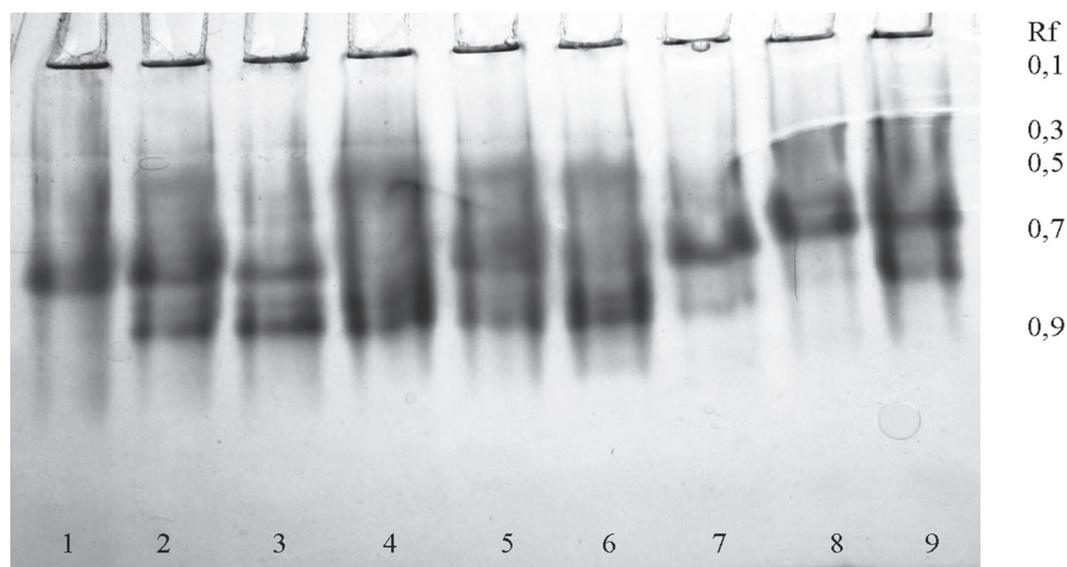


Рис. 1. Изоферментный спектр пероксидазы листьев *Dioscorea* под действием ДНАТ-400 на модифицированном ионообменном субстрате: 1 – с бентонитом в концентрации 0,5 г/л; 2 – с бентонитом в концентрации 1,0 г/л; 3 – с гуматом в концентрации 0,5 г/л; 4 – с гуматом в концентрации 1,0 г/л; 5 – с гидрогелем крупной фракции в концентрации 0,5 г/л; 6 – с гидрогелем крупной фракции в концентрации 1,0 г/л; 7 – с калием в концентрации 0,5 г/л; 8 – с калием в концентрации 1,0 г/л; 9 – без модификации (контроль)



Рис. 2. Изоферментный спектр пероксидазы листьев *Dioscorea* при облучении светом ДНАТ-400 на модифицированном ионообменном субстрате с гидрогелем мелкой фракции в концентрациях 0,5 г/л (1) и 1,0 г/л (2)

и $R_f = 0,8$. Также увеличивается активность минорной компоненты (0,34).

R_f Гумат, как и бентонит, оказывает сильное влияние на динамику изоферментов пероксидазы. В частности, на треке № 3 (табл. 1) наблюдается увеличение активности изоформ с $R_f = 0,819$ и $R_f = 0,65$. Белковые полосы в электрофоретических исследованиях листьев диоскореи на среде с гуматом отличаются по интенсивности окрашивания с бентонитом, что говорит о разном вовлечении этих изоформ в эффекты, вызываемые воздействием гидрогеля с бентонитом и гуматом на растения *Dioscorea alata* L. Согласно литературным данным [9], существуют эффекты воздействия различных концентраций одновалентных и двухвалентных катионов на активность пероксидазы растений. Полученные нами на треках № 7 и № 8 (табл. 1) экспериментальные данные отражают влияние K^+ в концентрациях 0,5 и 1 г/л на растения *Dioscorea alata* L. Максимальной активностью обладает изоформа с $R_f = 0,65$ (рис. 1, 2), без видимого превалирования других форм.

Таким образом, пероксидазы *Dioscorea alata* L. представляют собой чувствительный сенсор на различные типы воздействия с гидрогелем. Вместе с тем сам фракционный состав гидрогеля оказывает влияние на активность и изоферментный спектр пероксидазы: чем выше концентрация гидрогеля, тем более высокая активность пероксидазы. Существенное

влияние на активность пероксидазы оказывает и количество добавленного гидрогеля, что видно из треков № 1 и № 2 (рис. 1, 2). Модифицированный ионообменный субстрат ТРИОНА® с бентонитом, гуматом, крупной фракцией в концентрации 1,0 г/л оказывает максимальное влияние на активность и изоферментный спектр пероксидазы. В то же время гидрогель с концентрацией 0,5 г/л оказывает минимальное влияние и, следовательно, не является стресс-образующим фактором для растений *Dioscorea alata* L.

Т а б л и ц а 1. Компьютерная обработка электрофореграммы рис. 1, 2

К-во изоформ	Трек 1	Трек 2	Трек 3	Трек 4	Трек 5	Трек 6	Трек 7	Трек 8	Трек 9	Трек 10	Трек 11
Band	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
1	0,039	0,043	0,057	0,32	0,36	0,39	0,012	0,008	0,064	0,066	0,074
2	0,31	0,34	0,5	0,48	0,65	0,65	0,65	0,093	0,177	0,3	0,279
3	0,455	0,45	0,56	0,71	0,82	0,79	0,72	0,176	0,194	0,519	0,313
4	0,63	0,63	0,65	0,8				0,54	0,65	0,524	0,536
5		0,734	0,728					0,65	0,72	0,609	0,91
6		0,821	0,819					0,72			

Спектральный состав света также оказывал воздействие на активность пероксидазы. Из представленных данных (рис. 3, табл. 2) следует, что ДНАТ-400 является мощным активатором пероксидазы у *Dioscorea alata* L. На рис. 3 представлены экспериментальные данные по изоферментному составу пероксидазы растений *Dioscorea alata* L., выращенных под действием люминесцентного источника света ЛБ-40. В данном варианте активность и изоферментный спектр пероксидаз изменяется несущественно. Возможно, это связано с тем, что ДНАТ-400, являясь высокоэнергетичным светом, приводит к образованию АФК, а следовательно, и к повышению активности пероксидазы, чего не наблюдается при использовании ЛБ-40. Полученные нами данные (рис. 3) демонстрируют влияние концентрации гидрогеля на активность изоферментного спектра пероксидаз при облучении растений от источника света ЛБ-40.

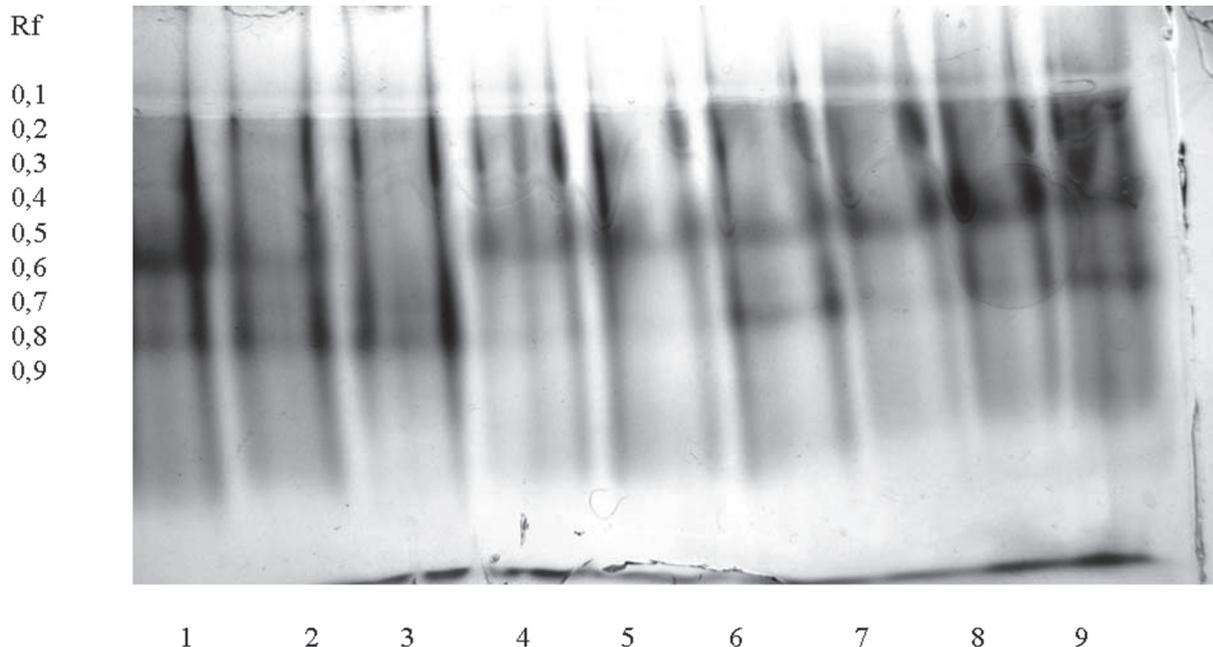


Рис. 3. Изоферментный спектр пероксидазы листьев *Dioscorea* под действием ЛБ-40 на модифицированном ионообменном субстрате: 1 – с гидрогелем мелкой фракции в концентрации 1,0 г/л; 2 – с гидрогелем мелкой фракции в концентрации 0,5 г/л; 3 – с бентонитом в концентрации 1,0 г/л; 4 – с бентонитом в концентрации 0,5 г/л; 5 – с гуматом в концентрации 1,0 г/л; 6 – с гуматом в концентрации 0,5 г/л; 7 – с калием в концентрации 0,5 г/л; 8 – с гидрогелем крупной фракции в концентрации 0,5 г/л; 9 – без модификации (контроль)

Т а б л и ц а 2. Компьютерная обработка электрофореграммы рис. 3

К-во изоформ	Трек 1	Трек 2	Трек 3	Трек 4	Трек 5	Трек 6	Трек 7	Трек 8	Трек 9
Band	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
1	0,121	0,039	0,103	0,054	0,089	0,08	0,039	0,041	0,043
2	0,411	0,56	0,566	0,093	0,567	0,096	0,302	0,134	0,283
3	0,565	0,74	0,671	0,099	0,8	0,127	0,328	0,214	
4	0,848	0,84		0,562		0,554	0,56	0,224	
5						0,8	0,8	0,245	
6								0,57	
7								0,84	

Таким образом, показано, что как и при облучении ДНАТ-400, гидрогели (с бентонитом, гуматом, калием и без удобрений крупной и мелкой фракций) различной концентрации влияют на активность и динамику изоферментов. Например, треки № 1 и № 2 (табл. 2) демонстрируют влияние концентрации гидрогеля с 0,5 и 1 г/л. Наблюдается увеличение активности изоферментов пероксидазы с $Rf = 0,565$. Подобным образом гидрогель с бентонитом в тех же концентрациях влияет на активность и изоферментный спектр пероксидазы (треки № 3 и № 4, рис. 3). Гидрогель с гуматом в концентрации 0,5 г/л оказывает обратный эффект на активность изучаемого фермента, т. е. более низкая концентрация оказывает большее влияние на активность изоформы с $Rf = 0,8$. Возможно, это связано с тем, что более низкая концентрация оказывает меньшее влияние на растение в целом, и при таком влиянии изоферментный состав пероксидазы близок к контролю. Добавление гидрогеля с K^+ приводит к общему снижению пероксидазной активности, что, возможно, связано со стресс-протекторной ролью ионов K^+ для растений *Dioscorea alata* L.

Заключение. Используя новый класс почвенных мелиорантов – гидрогелей различного состава, способных поглощать и удерживать в набухшем состоянии огромное количество влаги с растворенными в нем питательными веществами, можно модифицировать влажностные свойства ионообменного субстрата ТРИОНА® для ускорения процессов адаптации нового для Беларуси интродукта диоскорей (*Dioscorea alata* L.). Согласно полученным данным, гидрогели

различной концентрации и разного фракционного состава влияют на активность и динамику изоферментов пероксидазы. Таким образом, пероксидазы *Dioscorea alata* L. представляют собой чувствительный сенсор на различные типы воздействия с гидрогелем. Спектральный состав света также оказывает воздействие на активность пероксидазы. Исходя из полученных экспериментальных данных по изоферментному составу пероксидазы растений *Dioscorea alata* L., выращенных под действием искусственного света ламп ЛБ-40 и ДНАТ-400, установлено, что ДНАТ-400, являясь высокоэнергетичным светом, приводит к образованию АФК, а следовательно, и к повышению активности пероксидазы, чего не наблюдается при использовании ЛБ-40.

Список использованных источников

1. Тарчевский, И. А. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский. – М.: Наука, 2002. – 294 с.
2. Янчевская, Т. Г. Оптимизация минерального питания растений / Т. Г. Янчевская. – Минск: Беларус. навука, 2014. – 458 с.
3. Спектральные характеристики источника света и особенности роста растений в условиях искусственного освещения / Н. И. Протасов [и др.] // Физиол. раст. – 1990. – Т. 37. – Вып. 2. – С. 30–35.
4. Солдатов, В. С. Ионообменные равновесия в многокомпонентных системах / В. С. Солдатов, В. А. Бычкова. – Минск: Наука и техника, 1988. – 360 с.
5. Янчевская, Т. Г. Оптимизация содержания катионов и анионов в среде корнеобитания для максимального коэффициента размножения картофеля *in vivo* / Т. Г. Янчевская, В. А. Бобров // Ботаника: исследования. – 2008. – Т. 35. – С. 495–506.
6. Янчевская, Т. Г. Ионообменные питательные субстраты – их уникальные свойства и области применения / Т. Г. Янчевская, К. В. Бахнова, А. Л. Ольшаникова // Ботаника: исследования. – Минск: Право и экономика, 2005. – Вып. 33. – С. 361–366.
7. Хайрулин, Р. М. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. Активация анионных изоформ пероксидазы в проростках пшеницы при инфицировании спорами *Tilletia caries* / Р. М. Хайрулин, З. Р. Юсупова, Н. Б. Трошина // Физиол. раст. – 2000. – Т. 47, № 1. – С. 114–119.
8. Юсупова, З. Р. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы грибными патогенами / З. Р. Юсупова, Р. М. Хайрулин, И. В. Максимов // Физиол. раст. – 2006. – Т. 53, № 6. – С. 910–917.
9. Beauchamp, C. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // J. Analyt. Biochem. – 1971. – Vol. 44, N 3. – P. 276–287.
10. Molinari, S. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes / S. Molinari, E. Loffredo // Physiol. & Mol. Plant Patol. – 2006. – Vol. 68, N 1–3. – P. 69–78.

Поступила в редакцию 21.03.2016

УДК 579.25+575.224

*А. А. МУРАТОВА, М. Н. МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ, Т. Л. НОСОНОВА,
Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ, Э. И. КОЛОМИЕЦ, М. А. ТИТОК*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ,
ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM БИМ В-446**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: Anutik-2041@ya.ru*

В результате транспозонного мутагенеза бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 отобрано более 100 мутантов, характеризующихся отличной от исходного штамма антимикробной активностью, синтезом флуоресцирующих пигментов и подвижностью. Молекулярно-генетический анализ четырех мутантов позволил установить, что изменения исследованных признаков обусловлены встраиванием транспозона mini-Tn5 в регуляторные гены (транскрипционные факторы), обеспечивающие регуляцию общего метаболизма бактериальной клетки.

Ключевые слова: мутагенез, антимикробная активность, флуоресценция, *Pseudomonas brassicacearum*, секвенирование.

*A. A. MURATOVA, M. N. MANDRYK-LITVINKOVICH, T. L. NASONOVA,
L. N. VALENTOVICH, E. I. KOLOMIETS, M. A. TITOK*

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF THE DETERMINANTS ASSOCIATED
OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF BACTERIA *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* BIM B-446**

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: Anutik-2041@ya.ru*

As a result of transposon mutagenesis of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446, more than 100 mutants were selected and characterized with different antimicrobial activity, the synthesis of fluorescent pigments and mobility, comparing with original strain. Molecular genetic analysis of four mutants revealed that changing's in studied properties were caused by inserting a mini-Tn5 transposon in the regulatory genes (transcription factors), that determinate regulation of the general metabolism of the bacterial cell.

Keywords: mutagenesis, antimicrobial activity, fluorescence, *Pseudomonas brassicacearum*, sequencing.

Введение. Повсеместно распространенные бактерии рода *Pseudomonas* продуцируют во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений (антибиотики, сидерофоры, гормоны, ферменты), которые обладают способностью подавлять патогенную микрофлору и стимулировать рост и развитие растений [1]. Наиболее активные штаммы-продуценты являются перспективными при создании биопрепаратов для получения экологически чистых продуктов сельского хозяйства.

Молекулярно-генетический анализ бактерий позволяет не только изучать механизмы синтеза первичных и вторичных метаболитов, но и управлять этими процессами для создания штаммов с улучшенными свойствами.

Цель настоящей работы – молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись природные бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446, антагонисты фитопатогенов сельскохозяйственных культур [2, 3]. Глубинное культивирование бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 осуществляли на питательной среде LB и Мейнелла [4] в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при температуре 28–30 °С. Продолжительность культивирования составляла 24–48 ч.

Для получения мутантов бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 использовали метод транспозонного мутагенеза. Перенос транспозона mini-Tn5*xylE* в бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 осуществляли методом конъюгации [5]. Для этого клетки донора *E. coli* BW19851 (*recA*, Ω RP4 *tra*, *uidA::pir*⁺), содержащие суицидный вектор pUT::mini-Tn5*xylE*, и клетки реципиента *P. brassicacearum* БИМ В-446, находящиеся в стационарной фазе роста, сгущали в 5 раз, смешивали в соотношении 1:1 и полученную смесь наносили на стерильные мембранные фильтры (*Synpor 6*, размер пор 0,45 мкм), размещенные на поверхности полноценной агаризованной среды в чашках Петри. Скрещиваемые бактерии инкубировали в течение 18 ч при 30 °С, после чего клетки смывали физиологическим раствором и из соответствующих разведений высевали на селективные среды.

Оценку антимикробной активности проводили с помощью метода лунок [6]. В качестве тест-культур использовали штамм фитопатогенных бактерий *P. syringae* БИМ В-280 из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Культуры фитопатогенных бактерий выращивали на мясоептонном бульоне в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при 28 °С в течение 24 ч.

Подвижность исследуемых бактерий определяли с использованием 0,5 %-ной агаризованной LB-среды, наличие флуоресценции регистрировали на агаризованной среде Кинг В [7].

Анализ на присутствие в клетках катехол-2,3-диоксигеназы осуществляли путем обработки клеток катехолом в концентрации 0,5 %. При наличии фермента катехол превращался в 2-гидроксимуконный семиальдегид, в результате чего клетки окрашивались в желтый или оранжевый цвет в зависимости от силы промотора, обеспечивающего экспрессию гена *xylE*.

Тотальную ДНК выделяли саркозиловым методом [8], плазмидную ДНК – с использованием набора реактивов Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Литва). Рестриктию плазмидной и тотальной ДНК, лигирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем (Thermo Scientific, Литва). Трансформацию бактерий *E. coli* XL1-Blue осуществляли согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве J. Sambrook и соавт. [9].

Для реакции секвенирования ДНК использовали набор реактивов Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, Affymetrix, США). Результаты анализировали с помощью компьютерных программ BLASTN2.2.1 (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), программного пакета eSeq V.3.1. (Li-COR Biosciences).

Результаты и их обсуждение. Известно, что свойство почвенных псевдомонад стимулировать рост и развитие растений (PGPR – plant growth-promoting rhizobacteria) обусловлено их способностью вступать в плотный контакт с корневой системой, выделяя во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений различной химической природы (антибиотики, фитогормоны, пигменты) [1]. При этом высокая колонизирующая активность и антимикробные свойства обеспечивают данным микроорганизмам селективное преимущество в природной среде обитания.

В результате введения в клетки *P. brassicacearum* БИМ В-446 суицидного вектора pUT::mini-Tn5*xylE* отобрано более 100 транспозонных мутантов, после чего были изучены их антимикробная активность, наличие флуоресцирующего пигмента и подвижность. Поскольку в состав транспозона входил репортерный ген *xylE* без промотора, отобранные мутантные варианты дополнительно проверяли на экспрессию последнего. Наличие продукта данного гена (катехол-2,3-диоксигеназы) могло свидетельствовать о его встраивании в состав хромосомы непосредственно за промоторной последовательностью инактивированной генетической детерминанты и служить дополнительным маркером, характеризующим сайт встраивания. Анализ транспозонных мутантов *P. brassicacearum* БИМ В-446 (всего проверено 100 вариантов) позволил условно разделить их на несколько фенотипических групп, отличающихся от штамма дикого типа различными комбинациями исследуемых признаков (см. таблицу). Например, среди мутантов, характеризующихся более выраженной, чем у исходного штамма, антимикробной активностью, отобраны варианты (в частности, мутант № 66), у которых отсутствовала подвижность, но увеличивался синтез флуоресцирующего пигмента и, наоборот, подвижность возрастала, но отсутствовал флуоресцирующий пигмент (мутанты № 15 и № 70). Отличались мутанты и сайтами локализации

mini-Tn5. В частности, у мутантов с более выраженной антимикробной активностью транспозон встраивался либо в структурную часть гена, либо за промотором с низкой активностью (колонии, обработанные катехолом, окрашивались в желтый цвет или оставались неокрашенными). Большинство отобранных мутантов (73 варианта) не обладали антимикробной активностью по отношению к патогену *P. syringae* БИМ В-280. При этом ряд мутантных вариантов характеризовался диаметрально противоположными свойствами. В частности, у 34 мутантов отсутствовал флуоресцирующий пигмент, а у 17 мутантов синтез пигмента, наоборот, увеличивался. При этом встраивание транспозона у всех вышеуказанных вариантов происходило за активной промоторной областью, что фиксировали по окрашиванию колоний в желтый цвет при обработке катехолом. Полученные результаты свидетельствуют, что транспозон mini-Tn5, встраиваясь в разные участки бактериальной хромосомы, приводит к изменению нескольких признаков одновременно, следовательно, происходит инактивация не структурных генов, а регуляторных, влияющих на целый ряд биохимических процессов, в том числе на антимикробные свойства, подвижность и синтез пигментов.

Сравнительная характеристика транспозонных мутантов *P. brassicacearum* БИМ В-446

Мутанты	Анализ мутантов на наличие			
	антимикробной активности	подвижности	флуоресцирующего пигмента	катехол-2,3-диоксигеназы*
31, 33	+	+/-	+	+
15, 67	+	+	-	+/-
68	+	+	+	-
65, 91, 98	+	+/-	+	+/-
18, 64, 81, 83, 89	+	+/-	-	-
66	+	-	+	+/-
11	+/-	+	-	+
17, 20, 25, 28, 38, 41	+/-	+/-	-	+/-
26, 49, 71, 92	+/-	+/-	+	+/-
21, 63	+/-	+/-	-	+
22, 29, 37, 39, 42, 45, 46, 52, 54, 56	+/-	+/-	+	-
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 19, 44, 47, 48, 53, 55, 57, 58, 59, 60, 69, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 80, 93, 95, 97	-	+/-	+	+/-
24, 27, 30, 32, 34, 35, 40, 61, 78, 82, 84, 85, 90, 94, 96, 99, 100	-	+/-	-	+/-
16, 43	-	+/-	-	+
23, 74	-	+/-	+	+
36, 50, 88	-	+/-	-	-
51, 62	-	-	+	+
70	-	+	-	+
86, 87	-	-	-	+/-

П р и м е ч а н и е. «+» – признак выражен сильнее, чем у исходного штамма; «+/-» – признак соответствует исходному штамму; «-» – признак отсутствует или выражен крайне слабо; «*» – результаты окраски колоний при обработке катехолом: «+» – колонии окрашены в оранжевый цвет, «+/-» – колонии окрашены в желтый цвет, «-» – колонии не окрашены.

Для 4 мутантов, характеризующихся разными свойствами (мутанты № 31, 70, 51 и 67), определяли нуклеотидные последовательности, в пределах которых произошло встраивание транспозона mini-Tn5. Для этого из клеток выделяли тотальную ДНК, обрабатывали рестриктазой PstI (сайт отсутствовал в пределах транспозона mini-Tn5) и лигировали с плазмидой pUC19, предварительно обработанной этой же рестриктазой. Гибридные конструкции, содержащие транспозон mini-Tn5 и окаймляющие его фрагменты хромосомы, отбирали в клетках *E. coli* XL1-Blue на среде с канамицином (транспозон mini-Tn5 детерминировал устойчивость к канамицину), добавляя X-gal и IPTG. Отобранные гибриды, содержащие фрагменты хромосомы размером до 12 т. п. н., использовали в качестве матриц для секвенирующей реакции с праймерами, отжигающимися на концах транспозона и направленными наружу. Анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей, примыкающих к транспозону, позволил установить, что транспозон

mini-Tn5 у мутантов с увеличенной антимикробной активностью (мутанты № 31 и № 67) встроился в гены, которые соответственно детерминируют транскрипционный регулятор семейства *LysR* и транскрипционный фактор, регулирующий углеводный обмен (ближайшие гомологи из штамма *P. brassicacearum subsp. brassicacearum* NFM421, CP002585.1). У мутантов с отсутствием антимикробной активности (мутанты № 51 и № 70) инсерция mini-Tn5 инактивировала гены, которые соответственно детерминируют синтез Zeta-токсина и S-аденозилметионин-зависимую метилтрансферазу, являющуюся глобальным регулятором многих биохимических процессов в клетке (ближайшие гомологи из штамма *P. brassicacearum subsp. brassicacearum* NFM421, CP002585.1).

Закключение. Таким образом, проведенный сиквенс-анализ не выявил вставок транспозона mini-Tn5 в область генов, детерминирующих синтез вторичных метаболитов, пигментов и жгутиков. Тем не менее, обнаружен ряд регуляторных генов, детерминирующих транскрипционные факторы и обеспечивающих регуляцию общего метаболизма, нарушения в которых приводят к изменению антимикробных свойств и синтеза флуоресцирующих пигментов, а также влияют на подвижность исследуемых бактерий.

Список использованной литературы

1. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable / M. W. Silby [et al.] // FEMS Microbiol Rev. FEMS Microbiol Rev. – 2011. – Vol. 35, N 4. – P. 652.
2. Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture / A. Epavier [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 1991. – Vol. 86. – P. 177–184.
3. Effect of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponics troughs / A. Khan [et al.] // Biocontrol Sci. Technol. – 2003. – Vol. 13. – P. 615–630.
4. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers / S. Chatterton [et al.] // Biol. Control. – 2004. – Vol. 30. – P. 360–373.
5. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing- and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative Eubacteria / V. de Lorenzo [et al.] // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172. – P. 6568–6572.
6. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос, 1983. – С. 253.
7. King, E. O. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein / E. O. King, M. K. Ward, D. E. Raney // J. Lab. Clin. Med. – 1954. – Vol. 44. – P. 301–307.
8. Te Riele, H. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* / H. te Riele, B. Michel, S. D. Ehrlich // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – Vol. 83, N 8. – P. 2541–2545.
9. Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Publications. – N. Y., 1989. – P. 468.

Поступила в редакцию 21.03.2016

УДК 581.9

А. Н. МЯЛИК

ЕВРОПЕЙСКИЙ ГЕОГРАФИЧЕСКИЙ ЭЛЕМЕНТ ВО ФЛОРЕ ПРИПЯТСКОГО ПОЛЕСЬЯ

*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: aleksandr-myalik@yandex.ru*

В статье представлен развернутый анализ европейского географического элемента флоры Припятского Полесья. Приводится описание каждого субэлемента с характерными примерами и распределением видов по соларно-климатическим зонам. Оцениваются хорологические особенности европейских видов.

Ключевые слова: Припятское Полесье, европейский географический элемент, хорологические особенности видов.

A. M. MIALIK

EUROPEAN GEOGRAPHICAL ELEMENT IN THE FLORA OF THE PRYPIACKAJE PALIESSIE

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: aleksandr-myalik@yandex.ru*

The article presents a detailed analysis of the European geographical element of the flora of the Prypiackaje Paliessie. Describe each of the sub with typical examples and the distribution of species on solar-climatic zones. Estimated chorological features of European species.

Keywords: Prypiackaje Paliessie, european geographical element, chorological characteristics of the species.

Введение. Флора Припятского Полесья, как и любой другой природной территории, сложена из видов, имеющих различное географическое происхождение: голарктических, евразийских, евросибирских, евросибирско-аралокаспийских, европейских и европейско-малоазийских [1]. Для того чтобы иметь представление о ее структуре и истории формирования, необходим аналитический разбор каждого географического элемента [2]. Самым многочисленным в составе флоры региона является европейский геоэлемент, представленный 226 видами, что составляет 24,3 % от общего числа аборигенных видов. К нему относятся виды, распространение которых ограничено европейским континентом: *Anemone nemorosa* (L.) Holub, *Carex hirta* L., *Thalictrum lucidum* L. и многие другие. В свою очередь эта группа видов в пределах Европы распространена крайне неравномерно, занимая различные ее части в зависимости от экологических требований вида. Поэтому при проведении географического анализа флоры Припятского Полесья европейский геоэлемент, как самый многочисленный и неоднородный, целесообразно рассматривать по субэлементам [3].

Цель настоящей работы – выяснение состава и хорологических особенностей европейского географического элемента во флоре Припятского Полесья.

Методика и объекты исследования. При аналитическом разборе европейского географического элемента использована схема геоэлементов флоры Беларуси, разработанная Н. В. Козловской [4] с внесенными нами дополнениями [5]. В ней долготные субэлементы (панъевропейский, северно-, центрально-, атлантическо-, восточно- и южно-европейский) выделены в зависимости от того, в какой части Европы располагаются ареалы видов. К *панъевропейскому* субэлементу относятся виды, широко распространенные в различных регионах Европы как в широтном, так и в долготном направлении. *Северно-европейский* субэлемент представлен

видами, распространение которых ограничено Фенноскандией, а также арктической и бореальной зонами Восточной Европы. Многие северно-европейские виды имеют дизъюнктивный ареал и встречаются как в бореальной зоне, так и в горных районах Европы (Альпы, Карпаты, Балканы, Пиренеи). **Центрально-европейские** виды распространены преимущественно в умеренной зоне Центральной Европы. Распространение **атлантично-европейских** видов ограничено атлантическим побережьем Европы, а также прибрежными территориями Северного и Балтийского морей. **Восточно-европейские** виды распространены преимущественно в центральной и южной частях Восточной Европы. Изредка их ареалы могут заходить в Центральную Европу либо в бореальную зону Восточной Европы. **Южно-европейский** (средиземноморский) субэлемент представлен видами, распространенными в южных районах Европы или в Средиземноморье [4]. Распределение видов по широтным геоэлементам выполнено согласно схеме соляро-климатических зон Европы, разработанной Г. Мойзелем [6]. При отнесении видов к тому или иному геоэлементу использованы работы [3, 6–11].

Результаты и их обсуждение. Согласно последним подсчетам, в составе флоры Припятского Полесья отмечено 930 аборигенных видов сосудистых растений [12]. Из них 226 таксонов относятся к европейскому географическому элементу, что составляет 24,3 % от общего видового состава. В таблице показано распределение европейских видов Припятского Полесья по долготным и широтным географическим субэлементам.

Распределение европейских видов по субэлементам

Долготный субэлемент	Широтные субэлементы							Итого	%
	Плоризональные	Аркто-бореально-температные	Бореальные	Бореально-температные	Температные	Субмеридиональные	Меридиональные		
Панъевропейский	30	4	—	10	24	4	—	72	31,9
Атлантический	—	—	—	5	18	—	—	23	10,2
Северный	—	2	3	7	—	—	—	12	5,3
Центральный	—	—	—	6	61	6	—	73	32,3
Восточный	—	—	—	3	14	16	—	33	14,6
Южный	—	—	—	—	—	10	3	13	5,7
Всего европейских видов	30	6	3	31	117	36	3	226	
%	13,3	2,7	1,3	13,7	51,8	15,9	1,3		100

Анализ таблицы показывает, что наиболее многочисленными во флоре Припятского Полесья являются центрально-европейские виды (73 таксона, или 32,3 %). Представители данного субэлемента в целом широко распространены в центральной части Европейского континента. Подавляющее большинство из них (61 таксон) относится к температурным видам (*Betula obscura* Kotula, *Melampyrum nemorosum* L., *Potentilla arenaria* Borkh., *Viola riviniana* Rchb. и др.) – самым многочисленным в составе любой региональной флоры центральной [13] и восточной части Европы [4, 14]. Бореально-температных видов в данной группе только 6: *Asarum europaeum* L., *Centaurea phrygia* L., *Thalictrum aquilegifolium* L. и некоторые другие. Столько же видов относится к более теплолюбивому субмеридиональному компоненту: *Carlina acaulis* L., *Trifolium rubens* L., *Viola reichenbachiana* Jord. ex Vogeau и др. Важно отметить, что 28 центрально-европейских видов на территории Припятского Полесья находятся на пределе своего естественного распространения, являясь тем самым хронологически-определенными для данной территории и Беларуси в целом. Почти все эти виды находятся здесь вблизи либо на восточных (*Allium ursinum* L., *Carex montana* L. и др.) и северо-восточных (*Daphne cneorum* L., *Glechoma hirsuta* Waldst. et Kit., *Trifolium dubium* Sibth. и др.) границах ареала [15]. Места их произрастания, как правило, приурочены к широколиственному лесам неморального типа.

Не менее многочисленны в составе флоры региона панъевропейские виды (72 таксона, или 31,9 %), которые широко распространены по всей территории Европы. Из них 30 видов относятся к плюризональным (*Briza media* L., *Ficaria verna* Huds., *Sorbus aucuparia* L. и др.), распространенным практически по всем солярно-климатическим зонам Европейского континента (от арктических до субтропических широт). К температурным относятся 24 вида, ареалы которых сосредоточены в умеренных широтах Европейского континента: *Quercus robur* L., *Polygala vulgaris* L., *Scorzonera humilis* L. и др. Бореально-температных видов только 10 (*Centaurea jacea* L., *Jasione montana* L., *Hieracium sylvestri* Tausch и др.). Закономерно, что аркто-бореально-температных (*Carex digitata* L., *Stellaria nemorum* L. и др.) и субмеридиональных (*Phyteuma spicatum* L., *Salvia pratensis* L. и др.) видов, приуроченных к северным и южным широтам соответственно, среди европейских видов флоры Припятского Полесья только по 4 представителя. Среди таксонов, относящихся к панъевропейскому субэлементу (ввиду широкого их распространения по всей территории Европы), хорологически-определенные виды отсутствуют.

Виды восточно-европейского распространения в составе флоры Припятского Полесья составляют 14,6 % от всех представителей европейского геоэлемента. Среди них наиболее многочисленны (16 таксонов) умеренно-теплолюбивые субмеридиональные виды: *Aristolochia clematitis* L., *Silene tatarica* (L.) Pers., *Urtica kioviensis* Rogow. и др. К температурному субэлементу относится 14 восточно-европейских видов (*Gladiolus imbricatus* L., *Thalictrum lucidum* L., *Thymus pulegioides* L. и др.), распространенных, как правило, в лесостепных районах Восточной Европы. Только 3 вида (*Corydalis solida* (L.) Clairv., *Dianthus borussicus* (Vierh.) Juz. и *Pilosella* × *caespitosa* (Dumort.) P. D. Sell et West) относятся к бореально-температным – их ареалы захватывают бореальную зону Восточной Европы. Среди всех восточно-европейских видов к хорологически-определенным относится 12 таксонов. Это преимущественно умеренно-теплолюбивые виды, находящиеся здесь на северо-западной и западной границах ареала. В Припятском Полесье эти виды (*Eragrostis rivalis* H. Scholz, *Iris aphylla* L., *Koeleria delavignei* Czern. ex Domin и др.) встречаются преимущественно в долине реки Припяти и ее крупнейших притоков [3, 15].

Атлантическо-европейский субэлемент представлен 23 видами, что составляет 10,2 % от их общего количества. Это исключительно умеренно-теплолюбивые (температные) виды, распространенные в средних широтах Европы: *Carex davalliana* Sm, *Corynephorus canescens* (L.) P. Beauv., *Holcus mollis* L. и др. Большинство атлантическо-европейских видов на территории Припятского Полесья находятся вблизи либо на восточной границе естественного ареала, поскольку их распространение на восток сдерживается нарастающей континентальностью климата. К таким видам относятся *Hypericum humifusum* L., *Spergula morisonii* Boreau, *Teesdalia nudicaulis* (L.) R. Br. и др. [3]. Некоторые виды (*Hedera helix* L.) на территории Припятского Полесья находятся в островных локалитетах на значительном удалении от основного ареала.

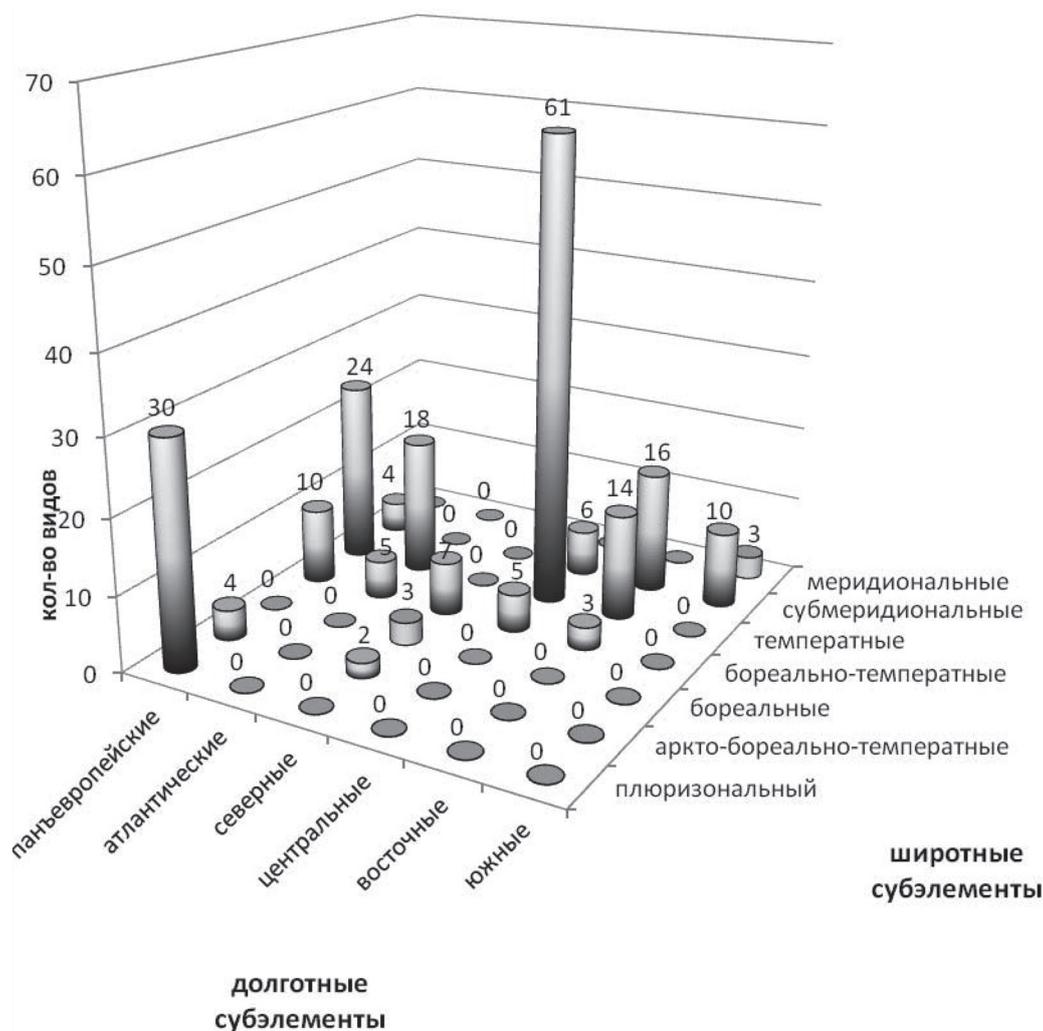
К наиболее теплолюбивому южно-европейскому географическому субэлементу относятся 13 (5,7 %) видов. Эти субмеридиональные (*Leontodon danubialis* Jacq, *Prunella grandiflora* (L.) Scholler, *Campanula rapunculus* L. и др.) и меридиональные (*Helianthemum nummularium* (L.) Mill., *Dianthus armeria* L., *Ulmus suberosa* Moench и др.) виды приурочены исключительно к широколиственным лесам, остепненным лесным полянам и опушкам, либо к нарушенным местообитаниям (обочины дорог, лесные просеки, дамбы, карьеры, насыпи). Почти все они на территории Припятского Полесья находятся на северной границе естественного ареала: *Dianthus armeria* L., *Juncus capitatus* Weigel, *Prunella grandiflora* (L.) Scholler и некоторые другие [15].

Северно-европейский субэлемент является самым малочисленным и представлен только 12 (5,3 %) таксонами. Из них 7 видов в отношении распространения по солярно-климатическим зонам относятся к бореально-температным: *Euphrasia fennica* Kihlm, *Hottonia palustris* L., *Polygala amarella* Crantz и др. Характерной особенностью данного субэлемента является то, что большинство умеренно-холодостойких аркто-бореально-температных (*Trollius europaeus* L.) и бореальных (*Alchemilla gracilis* Opiz, *Picea abies* (L.) H. Karst) видов находятся здесь на южном пределе своего естественного распространения [15]. Некоторые из них (*Picea abies* (L.) H. Karst) на территории Белорусского Полесья имеют хорологическую дизъюнкцию между равнинной бореальной и горной частями ареалов [17]. Характерной особенностью флоры Припятского Полесья

(в сравнении с другими региональными флорами Беларуси и Восточной Европы) является меньшее участие видов данного субэлемента в формировании аборигенной флоры [1, 4, 13, 16], что обусловлено более южным положением данного региона.

Рассматривая распределение европейских видов по солярно-климатическим зонам, следует отметить, что в составе флоры Припятского Полесья преобладают (51,8 %) умеренно-теплолюбивые температурные виды: *Mercurialis perennis* L., *Trifolium alpestre* L., *Polygala vulgaris* L. и многие другие. Достаточно многочисленными (15,9 %) являются виды субмеридионального распространения (*Phyteuma spicatum* L., *Trifolium dubium* Sibth, *Lathyrus laevigatus* (Waldst. et Kit.) Gren. и др.), что обусловлено положением региона на юге Беларуси. Широко распространенные в пределах Европы плюризональные и бореально-температные европейские виды во флоре Припятского Полесья составляют 13,3 и 13,7 % соответственно. Вполне объяснимо, что холодостойкие аркто-бореально-температные и бореальные виды, как и теплолюбивые меридиональные, являются самыми малочисленными (их суммарное участие в составе европейского геоэлемента не превышает 6 %).

Оценивая значение отдельных европейских субэлементов в формировании аборигенной фракции флоры Припятского Полесья (см. рисунок) следует отметить, что основу флоры региона составляют бореально-температные, температурные и субмеридиональные виды с центрально-, восточно- и панъевропейскими типами ареалов, а также плюризональные панъевропейские виды, широко распространенные по всей территории Европы. Такое соотношение в целом свойственно всей аборигенной флоре Беларуси [4]. Характерной особенностью флоры Припятского



Взаимосвязь между долготными и широтными геоэлементами

Полесья, ввиду географического положения данной территории на юге Беларуси, является большее количество теплолюбивых субмеридиональных и меридиональных видов с одной стороны и значительно меньшее участие умеренно-холодостойких и холодостойких бореальных и арктобореальных видов – с другой.

Заключение. Таким образом, европейский географический элемент, самый многочисленный в составе аборигенной флоры Припятского Полесья, неоднороден и представлен видами с различными типами ареалов, что позволяет выделить панъевропейский, северный, атлантический, восточный, центральный и южный субэлементы. В составе флоры рассматриваемого нами региона, как и Беларуси в целом, наибольшее участие имеют температурные, субмеридиональные, бореально-температурные центрально- и восточноевропейские, а также панъевропейские виды. Некоторые представители северно- (*Picea abies* (L.) H. Karst, *Trollius europaeus* L.), южно- (*Dianthus armeria* L., *Juncus capitatus* Weigel), восточно- (*Aristolochia clematitis* L., *Iris aphylla* L.) и атлантичеко-европейских (*Hedera helix* L., *Teesdalia nudicaulis* (L.) R. Br.) субэлементов на территории Припятского Полесья находятся на пределе естественного распространения, являясь тем самым хронологически определенными видами [16], которые имеют ту или иную зоологическую ценность.

Список использованной литературы

1. Парфенов, В. И. Флора Белорусского Полесья: современное состояние и тенденции развития / В. И. Парфенов. – Минск: Наука и техника, 1983. – 295 с.
2. Толмачев, А. И. Введение в географию растений / А. И. Толмачев. – Ленинград: Изд-во Ленинград. ун-та, 1974. – 244 с.
3. Козловская, Н. В. Хорология флоры Белоруссии / Н. В. Козловская, В. И. Парфенов. – Минск: Наука и техника, 1972. – 309 с.
4. Козловская, Н. В. Флора Белоруссии, закономерности ее формирования, научные основы использования и охраны / Н. В. Козловская. – Минск: Наука и техника, 1978. – 128 с.
5. Мялик, А. Н. Анализ географического распространения видов аборигенной флоры Припятского Полесья / А. Н. Мялик // Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 2. – С. 15–21.
6. Meusel, H. Vergleichende Chorologie der zentraleuropaischen Flora / H. Meusel, E. Jager, E. Weinert. – Jena: Fischer, 1965. – Bd 1. – 583 s.
7. Meusel, H. Vergleichende Chorologie der zentraleuropaischen Flora / H. Meusel, E. Jager, E. Weinert. – Jena: Fischer, 1965. – Bd 2. – 258 s.
8. Hulten, E. Flora of Alaska and Neighboring Territories (a manual of the vascular plants) / E. Hulten. – Stanford: Stanford Univ. Press, 1974. – 1008 p.
9. Флора Беларуси. Сосудистые растения: в 6 т. / под общ. ред. В. И. Парфенова; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича. – Т. 1: Lycopodiophyta. Equisetophyta. Polypodiophyta. Ginkgophyta. Pinophyta. Gnetophyta / Р. Ю. Блажевич [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2009. – 199 с.
10. Флора Беларуси. Сосудистые растения: в 6 т. / под общ. ред. В. И. Парфенова; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т эксперим. ботаники им. В. Ф. Купревича. – Т. 2: Liliopsida / Д. И. Третьяков [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2013. – 447 с.
11. Екофлора України: в 6 т. / відпов. ред. Я. П. Дідух. – Київ: Фітосоціоцентр, 2010. – Т. 6.
12. Мялик, А. Н. Таксономический анализ флоры Припятского Полесья / А. Н. Мялик // Материалы XVII Респ. науч.-практ. конф. молодых ученых: в 2 ч., Брест, 15 мая 2015 г. / БрГУ им. А. С. Пушкина; редкол.: А. Е. Будько [и др.]. – Брест, 2015. – Ч. 1. – С. 112–114.
13. Witoslawski, P. Southern European species in the flora of towns in the central Poland / P. Witoslawski, A. Bomanowska // Botanica Serbica. – 2009. – Vol. 33. – Suppl. 2. – P. 115–129.
14. Лукаш, О. В. Флора судинних рослин Східного Полісся: структура та динаміка / О. В. Лукаш. – Київ: Фітосоціоцентр, 2009. – 200 с.
15. Мялик, А. Н. Ботанико-географические особенности полесской хронологической дизъюнкции / А. Н. Мялик // Современное состояние, тенденции развития, рациональное использование и сохранение биологического разнообразия растительного мира, Минск–Нарочь, 23–26 сент. 2014 г. / НАН Беларусі [и др.]; редкол.: А. В. Пугачевский [и др.]. – Минск, 2014. – С. 114–117.
16. Коломійчук, В. П. Географічний аналіз флори берегової зони Азовського моря / В. П. Коломійчук // Біол. вісн. МДПУ. – 2012. – № 2. – С. 74–79.
17. Парфенов, В. И. Обусловленность распространения и адаптации видов растений на границах ареалов / В. И. Парфенов. – Минск: Наука и техника, 1980. – 208 с.

Поступила в редакцию 02.06.2015

УДК 579.695

Р. К. НАГОРНЫЙ, А. С. САМСОНОВА, Е. М. ГЛУШЕНЬ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЧИСТКИ АБСОРБЦИОННЫХ РАСТВОРОВ
ОТ ТРИЭТИЛАМИНА И ДИМЕТИЛЭТИЛАМИНА
МИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТОМ «ТЭАМИН»**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: Roman19031988@mail.ru*

Промышленные испытания препарата «Тэамин» показали, что его внесение в абсорбционно-биохимическую установку способствует полной регенерации абсорбционного раствора, содержащего триэтиламин и диметилэтиламин в концентрациях 113 и 117 мг/л соответственно. Достигнутый уровень очистки дает возможность рекомендовать препарат «Тэамин» для широкого использования.

Ключевые слова: триэтиламин, диметилэтиламин, микробная очистка.

R. NAGORNY, A. SAMSONOVA, E. HLUSHEN

**CLEANING EFFICIENCY OF ABSORPTION SOLUTION FROM TRIETHYLAMINE AND DIMETHYLAMINE
BY MICROBIAL PREPARATION TEAMINE**

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: Roman19031988@mail.ru*

The completed industrial tests of Teamine action demonstrated that its introduction into biochemical absorption unit resulted in complete regeneration of process solution containing triethylamine and dimethylethylamine in concentrations 113 and 117 mg/l, respectively. The achieved decontamination level enables to recommend Teamine for further broad application.

Keywords: triethylamine, dimethylethylamine, microbial treatment.

Введение. В последние десятилетия широкое распространение получили биологические методы очистки производственного воздуха от летучих органических соединений, такие как биофильтрация и абсорбционно-биохимическая очистка [1–3]. На крупнейших машиностроительных предприятиях стран СНГ для удаления триэтиламина (ТЭА) и диметилэтиламина (ДМЭА) из воздушных потоков активно используются абсорбционно-биохимические установки (АБХУ). Они представляют собой локальные биологические очистные сооружения, в которых используется оборотное водоснабжение, что исключает образование сточных вод и позволяет сократить расходы на водоснабжение. ТЭА и ДМЭА, содержащиеся в очищаемом воздухе, абсорбируются в скруббере. Образовавшийся раствор направляется в биореактор для биологической очистки. Одним из основных факторов, определяющих эффективность работы АБХУ, является интенсивность регенерации абсорбционного раствора, которая зависит от активности микроорганизмов, осуществляющих процесс утилизации аминов [1].

Для разработки эффективной технологии регенерации абсорбционных растворов из природной среды нами выделены штаммы *Rhodococcus qingshengii* НСТ-32 [4] и *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 [5] – высокоактивные деструкторы ТЭА и ДМЭА. На их основе в рамках задания 1.20 «Разработать технологию производства и применения микробного препарата Тэамин для очистки абсорбционных растворов от триэтиламина и диметилэтиламина» Государственной научно-технической программы «Промышленные биотехнологии» на 2011–2015 гг. разработан не имеющий мировых аналогов препарат микробный «Тэамин» (ТУ ВУ 100289066.134-2015),

© Нагорный Р. К., Самсонова А. С., Глушень Е. М., 2016

предназначенный для очистки сточных вод и абсорбционных растворов от данных ксенобиотиков.

Цель данной работы – оценка эффективности применения препарата микробного «Тэамин» для регенерации абсорбционного раствора, содержащего триэтиламин и диметилэтиламин.

Объекты и методы исследования. Опытнo-промышленная партия препарата микробного «Тэамин» (200 л) наработана в ферментере LiFlus SP 300L в Биотехнологическом центре Института микробиологии НАН Беларуси. Титр клеток в готовом препарате составил $1,2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Титр клеток микроорганизмов-деструкторов ТЭА и ДМЭА в абсорбционном растворе учитывали на агаризованной среде следующего состава (г/л): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,6; KH_2PO_4 – 0,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; ТЭА либо ДМЭА – 1,0 (рН 7,0). Контрольный высеv проводили на минеральную среду Е-8.

Для проведения производственных испытаний опытнo-промышленная партия препарата была внесена в биореактор АБХУ, функционирующей в литейном цехе ковкого чугуна ОАО «Минский автомобильный завод». Объем биореактора установки – 16 м³. Исходные концентрации ТЭА и ДМЭА в абсорбционном растворе составили 113 и 117 мг/л соответственно.

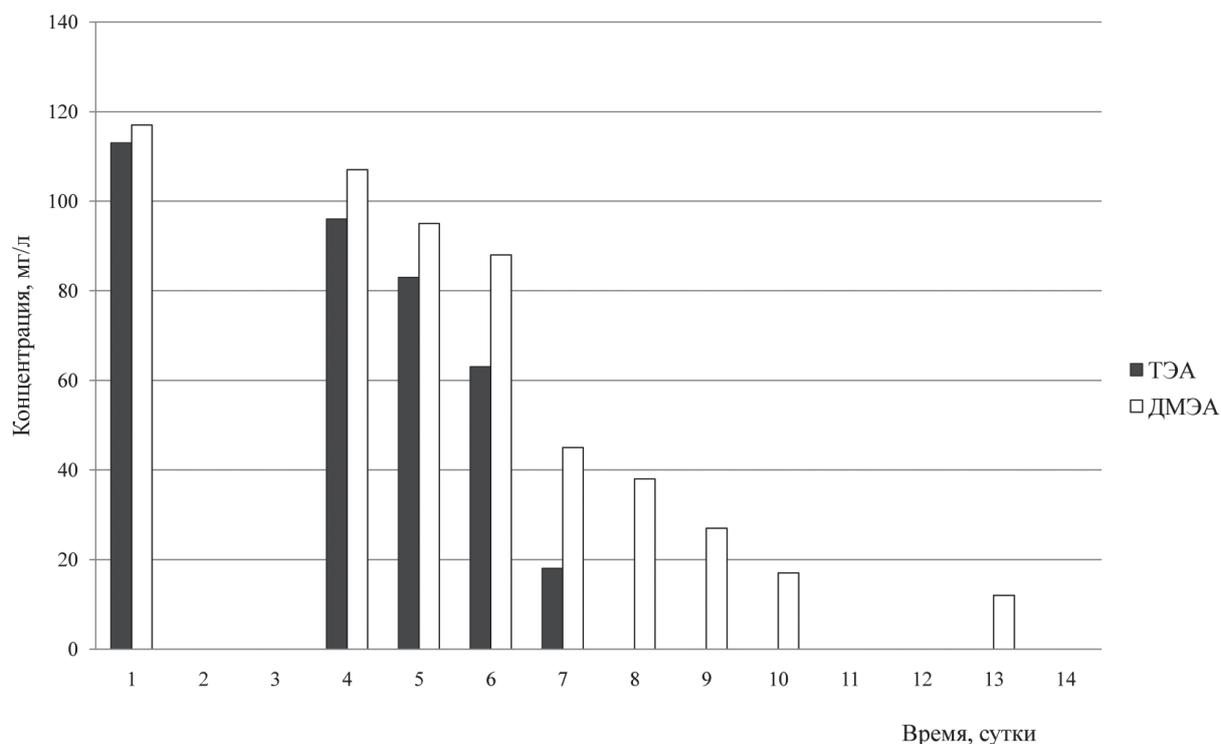
Об эффективности очистки абсорбционного раствора от ТЭА и ДМЭА судили по интенсивности снижения концентраций данных ксенобиотиков. Анализируемые образцы подвергали воздействию ультразвука на дезинтеграторе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт, температура – 4 °С, продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с. Клеточный экстракт центрифугировали 15 мин при 15 000 g. Остаточное содержание ТЭА, ДМЭА и продуктов их катаболизма в супернатанте определяли на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с масс-детектором Agilent 6410 Triple Quad. Разделение компонентов в анализируемых образцах проводили на колонке Zorbax XDB C18 (4,6×50 мм; 1,8 мкм) при температуре 25 °С. Объем инъекции составлял 0,002 см³. Подвижные фазы: А – 0,1 %-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, В – ацетонитрил. Использовали изократический режим элюирования 2 % фазы В. Скорость течения элюента – 0,5 см³/мин. Интерфейс ионизации – электроспрей Agilent G1948B API-ES в режиме положительных ионов. Для проведения анализа использовали режимы полного сканирования (MS2-Scan) в диапазоне масс от 30 до 200 Да. Параметры работы детектора: температура осушающего газа – 300 °С, скорость потока осушающего газа – 10 дм³/мин, давление на распылителе – 30 psi, напряжение на капилляре – 4000 В, напряжение на фрагментаторе – 60 В. Анализ хроматограмм проводили с использованием программного обеспечения Agilent MassHunter Workstation Software version B.01.03 (Agilent Technologies Inc., США).

Анализ содержания иона аммония в образцах абсорбента проводили методом капиллярного электрофореза с использованием Agilent 3D Capillary Electrophoresis System. Использовали кварцевый наплавленный капилляр без покрытия (Agilent № G1600-62232) с эффективной длиной 72 см, внутренним диаметром 50 мкм и увеличенным оптическим путем. Ведущий электролит: готовый буферный раствор для анализа катионов (Agilent № 5064-8203). Условия электрофореза: температура капилляра 20 °С, напряжение – 30 кВ, продолжительность кондиционирования капилляра перед инъекцией рабочим буфером – 6 мин, продолжительность инъекции – 4 с при давлении 50 мБар, замена буферного раствора проводилась через 1 ч работы. Измерительная длина волны 350 нм (ширина полосы 80 нм), контрольная длина волны 245 нм (ширина полосы 10 нм). Для построения калибровочных кривых использованы растворы с концентрацией катионов 20 и 50 мг/л, приготовленные из готового стандартного раствора (Agilent №5064-8205).

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой средние величины 5 опытов. Расчеты производили с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. В результате проведения производственных испытаний препарата «Тэамин» выявлено, что его внесение в биореактор АБХУ способствует полной очистке абсорбционного раствора от ТЭА и ДМЭА за 7 и 13 сут соответственно (см. рисунок).

Следует отметить, что интенсивная аэрация абсорбционного раствора и поступление в него ДМЭА из воздушных потоков осуществлялись только на 6-е и 13-е сутки. Учитывая высокую скорость утилизации аминов в эти дни, несмотря на дополнительное поступление ДМЭА, можно констатировать, что интенсивность аэрации является определяющим фактором для эффективной



Динамика утилизации ТЭА и ДМЭА в абсорбционном растворе

регенерации абсорбционных растворов. Полученные результаты позволяют предположить, что при условии круглосуточной подачи сжатого воздуха в биореактор АБХУ полная очистка абсорбента достигалась бы за меньшее время. При изучении состава абсорбента в нем не выявлены промежуточные продукты катаболизма ТЭА и ДМЭА, т. е. биохимический процесс приводит к их полной минерализации.

Утилизация токсикантов сопровождалась увеличением титра клеток микроорганизмов-деструкторов от $1,25 \cdot 10^7$ (после внесения препарата) до $3,67 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Данный факт позволяет прогнозировать интенсивное накопление биомассы в абсорбенте при дальнейшей эксплуатации АБХУ, что, с одной стороны, вызывает необходимость периодической замены абсорбционного раствора, а с другой – позволяет использовать его часть в качестве источника микрофлоры. Таким образом, потребуется лишь частичная замена абсорбента на водопроводную воду, что исключает необходимость дополнительного внесения препарата «Тэамин».

Культуры, составляющие препарат «Тэамин», способны использовать как ТЭА, так и ДМЭА в качестве единственного источника азота. По этой причине в абсорбционный раствор не вносились азотсодержащие минеральные соли. Значительная массовая доля данного биогенного элемента в молекулах утилизируемых ксенобиотиков обуславливает его избыточное поступление в клетки микроорганизмов-деструкторов. Следствием этого является выделение бактериями аммония в абсорбционный раствор. Так как в АБХУ используется обратное водоснабжение, значительное накопление аммония в абсорбционном растворе может привести к снижению эффективности абсорбции аминов из воздушного потока и ингибированию процесса деструкции. В результате проведенных исследований выявлено, что аммоний действительно образовывался в абсорбенте. Его концентрация достигала максимального значения (5 мг/л) на 10-е сутки испытаний, но на 18-е сутки наблюдалась его полная утилизация.

Таким образом, производственные испытания препарата микробного «Тэамин» показали высокую эффективность его применения для регенерации абсорбционных растворов, содержащих ТЭА и ДМЭА.

Заключение. Внесение препарата микробного «Тэамин» в АБХУ, функционирующую в литейном цехе ковкого чугуна ОАО «Минский автомобильный завод», позволило интенсифицировать процесс очистки абсорбционного раствора от ТЭА и ДМЭА до полной его регенерации, что

исключает выделение токсикантов в воздух литейного цеха и атмосферу. Достигнутый уровень очистки абсорбционного раствора дает возможность рекомендовать препарат для широкого использования. Способность микроорганизмов, составляющих препарат «Тэамин», использовать ТЭА и ДМЭА в качестве единственного источника азота позволяет исключить необходимость внесения в абсорбционный раствор азотсодержащих солей.

Список использованной литературы

1. Шаповалов, Ю. П. Очистка вентиляционного воздуха – прогрессивный выбор / Ю. П. Шаповалов // *Металл-Инфо*. – 2007. – № 4. – С. 21.
2. *Torkian, A.* Effects of operational conditions on the performance of triethylamine biofiltration / A. Torkian, H. Keshavarzi, A. Azimi // *Iran. J. of Environmental Health Sci. and Engineering*. – 2005. – Vol. 2, N 2. – P. 31–40.
3. *Mehrdadi, N.* Removal of triethylamine vapor from waste gases by biotrickling filters / N. Mehrdadi, H. Keshavarzi, A. Azimi // *Iran. J. of Environmental Health Sci. and Engineering*. – 2010. – Vol. 7, N 4. – P. 334–337.
4. *Нагорный, Р. К.* Штамм *Rhodococcus qingshengii* В-823Д – деструктор триэтиламина / Р. К. Нагорный // *Молодежь в науке* – 2013. – Минск, 2013. – Ч. 3. – С. 114–118.
5. *Нагорный, Р. К.* Штамм *Rhodococcus jialingiae* НСТ-91 – деструктор триэтиламина и диметилэтиламина / Р. К. Нагорный, А. С. Самсонова // *Молодежь в науке* – 2014. – Минск, 2014. – Ч. 4. – С. 75–78.

Поступила в редакцию 21.03.2016

УДК 579.862.5:577.113

Д. Т. ПЛОТНИКОВА, А. В. СИДОРЕНКО, Г. И. НОВИК

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ РОДОВ *LACTOCOCCUS*, *ENTEROCOCCUS*, *LEUCONOSTOC*

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: danutaplotnikava@gmail.com

Проведен анализ антибиотикорезистентности коллекционных и выделенных из самоквасных молочных продуктов штаммов молочнокислых бактерий родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*. Выявлена схожесть фенотипических профилей антибиотикорезистентности у энтерококков и лактококков. Установлено, что коллекционные штаммы *L. lactis* устойчивы к более широкому спектру антибиотиков по сравнению со штаммами, выделенными из самоквасных молочных продуктов. Показано, что фенотипическая устойчивость молочнокислых бактерий к антибиотикам не всегда коррелирует с наличием трансмиссивных генетических детерминант антибиотикорезистентности, поэтому необходимо проводить мониторинг данного признака на фенотипическом и генетическом уровнях.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, антибиотикорезистентность, лактококки, энтерококки.

D. PLOTNIKOVA, A. SIDORENKO, G. NOVIK

EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIA FROM GENERA *LACTOCOCCUS*, *ENTEROCOCCUS*, *LEUCONOSTOC*

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: danutaplotnikava@gmail.com

Analysis of antibiotic resistance of collection and isolated from homemade dairy products strains of lactic acid bacteria belonging to genera *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* was performed. Similarity of phenotypic profiles of antibiotic resistance of lactococci and enterococci was established. It was shown, that collection strains *L. lactis* possess resistance to broader spectrum of antibiotics as compared to strains, isolated from homemade dairy products. Phenotypic resistance to antibiotics does not always correlate with presence of genetic determinants of antibiotic resistance, thus monitoring of this feature should be performed both on phenotypic and genotypic levels.

Keywords: lactic acid bacteria, antibiotic resistance, lactococci, enterococci.

Введение. Молочнокислые бактерии родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* благодаря их способности продуцировать ряд биологически активных соединений, в том числе молочную и другие органические кислоты, витамины, бактериоцины, полисахариды, находят широкое применение в пищевой и фармацевтической промышленности [1–4]. При попадании в желудочно-кишечный тракт человека молочнокислые бактерии могут участвовать в распространении генов антибиотикорезистентности среди представителей симбиотической кишечной микробиоты, а также патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [5, 6].

В настоящее время проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов приобрела угрожающие масштабы. По расчетам мировых экспертов, устойчивость патогенных бактерий к антибиотическим препаратам, используемым в медицинской практике, может привести к потере мировой экономикой 100 трлн долларов к 2050 г. и к ежегодной преждевременной смерти 10 млн человек. Наблюдаемая ситуация связана с длительным применением антибиотиков в сельском хозяйстве для лечения и профилактики заболеваний животных, а также в качестве стимуляторов их роста. Такое чрезмерное использование антибиотических препаратов способствовало появлению и распространению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [7, 8].

Поскольку единые международные нормы, регулирующие применение антибиотиков в животноводстве, до сих пор не разработаны, существует угроза, что продукты питания могут содержать резистентные патогенные микроорганизмы. В связи с обострением проблемы все большей устойчивости микроорганизмов к терапевтически значимым антибиотикам необходим тщательный мониторинг молочнокислых бактерий, используемых в пищевой и фармацевтической промышленности, на наличие данного признака. Для контроля безопасности промышленных штаммов микроорганизмов по признаку антибиотикорезистентности разработаны и внедрены в практику рекомендации Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) и Европейского ведомства по безопасности продуктов питания (EFSA) [9, 10].

Цель данной работы – изучение антибиотикоустойчивости коллекционных и выделенных из самоквасных молочных продуктов штаммов молочнокислых бактерий родов *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Leuconostoc* на фенотипическом и генетическом уровнях.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись 19 штаммов молочнокислых бактерий из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов: *Lactococcus lactis* БИМ В-132, БИМ В-424, БИМ В-425, БИМ В-426, БИМ В-905, БИМ В-906, БИМ В-907, БИМ В-908, БИМ В-909, *Enterococcus faecium* БИМ В-529, БИМ В-716, БИМ В-717, БИМ В-718, БИМ В-719, БИМ В-720, БИМ В-722, *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012, *Leuconostoc mesenteroides* БИМ В-910, БИМ В-911, а также 13 штаммов *L. lactis*, выделенных из самоквасных молочных продуктов. Молочнокислые бактерии выращивали в жидкой среде МРС (Conda, Испания) при температуре 30 °С (лактококки и лейконостоки) и 37 °С (энтерококки) в течение 24 ч.

Устойчивость молочнокислых бактерий к антибиотикам определяли методом двойных микроразведений в жидкой среде Мюллера–Хинтона (мясной экстракт – 3,0 г/л, гидролизат казеина – 17,5, глюкоза – 10,0, агар-агар – 17,0 г/л, рН 7,3 ± 0,2), используя стерильные 96-луночные полистирольные планшеты [11, 12]. Для этого 10 мкл бактериальной суспензии (0,5 единиц по стандарту мутности МакФарланда) вносили в 190 мкл среды Мюллера–Хинтона, содержащей соответствующие концентрации следующих антибиотиков: ампициллина, ванкомицина, гентамицина, стрептомицина, тетрациклина, эритромицина, хлорамфеникола, клиндамицина, канамицина, тилозина (AppliChem, Германия), инкубировали 24 ч при 30 °С (лактококки, лейконостоки) и 37 °С (энтерококки). За минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика (МИК) принимали концентрацию, приводящую к подавлению видимого роста молочнокислых бактерий. К антибиотикоустойчивым относили штаммы молочнокислых бактерий, для которых МИК соответствующего антибиотика превышал значения, рекомендованные EFSA [10].

Геномную ДНК молочнокислых бактерий выделяли с помощью коммерческого набора (Jena Bioscience, Германия) согласно прилагаемой инструкции. ПЦР-анализ на наличие генов антибиотикорезистентности проводили, используя праймеры, комплементарные генам устойчивости к тетрациклину – *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, эритромицину – *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, хлорамфениколу – *cat(TC)* (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Праймеры, используемые для ПЦР-анализа молочнокислых бактерий на наличие генов устойчивости к антибиотикам

Ген	Праймер	Последовательность праймера, 5'–3'	ПЦР-продукт, п. о.	Лит. источник
<i>tet(M)</i>	tetM-f tetM-r	ccaccgaatccttctgggc ccgagcagggatttctccac	444	[13]
<i>tet(O)</i>	tetO-f tetO-r	tcaatcgttccaaaatgagg ctaactgtggaacatagccgaacc	506	[13]
<i>tet(W)</i>	tetW-f tetW-r	caagatcgaccaggctggcg ggctgattggttctctgcg	206	[13]
<i>erm(A)</i>	ermA-f ermA-r	tctaaaagcatgtaaaagaa cttcgatagtttataatattagt	640	[14]
<i>erm(B)</i>	ermB-f ermB-r	acaggtaaaaggcatttaacgacg tggaacatctgtggtatggcg	438	[14]
<i>erm(C)</i>	ermC-f ermC-r	tcaaaacataatagataaa gctaataattgttaaactgctcaat	642	[14]

Ген	Праймер	Последовательность праймера, 5'-3'	ПЦР-продукт, п. о.	Лит. источник
<i>erm</i> (F)	ermF-f ermF-r	cgggtcagcactttactcttg ggacctacctcatagacaag	465	[14]
<i>cat</i> (TC)	catTC-f catTC-r	cgacggagagtgtaggtattgggataag gcactccatcgaactgaccatc	607	[14]

В работе применяли праймеры и реагенты производства «Праймтех» (Беларусь). Реакционная смесь содержала 1×АМ-буфер для *Taq*-полимеразы, 2,0 мкМ каждого дНТФ, 2,5 ед. *Taq*-полимеразы, 10 пМ каждого праймера, 10–20 нг хромосомной ДНК. Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере Eppendorf Mastercycler egradientS (Германия) с использованием активного точного режима регулирования. Температурно-временной профиль реакции амплификации: 94 °С – 5 мин (1 цикл); 94 °С – 20 с, 58 °С – 20 с, 72 °С – 1 мин (40 циклов); 72 °С – 5 мин (1 цикл). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с использованием 1×трис-ацетатного буфера при напряженности электрического поля 5 В/см и последующим окрашиванием геля раствором бромистого этидия (0,05 мкг/мл). В качестве стандарта для определения размера продуктов ПЦР применяли маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистический анализ результатов осуществляли, используя пакет программ Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Результаты, полученные при изучении антибиотикорезистентности 32 коллекционных штаммов молочнокислых бактерий родов *Lactococcus* (9 штаммов), *Enterococcus* (8 штаммов), *Leuconostoc* (2 штамма), а также 13 штаммов бактерий рода *Lactococcus*, выделенных из самоквасных молочных продуктов, представлены в табл. 2. Как видно из приведенных данных, значения МИК антибиотиков различались для штаммов одного вида, что свидетельствует о наличии индивидуальной устойчивости к антибиотическим препаратам. Для лактококков МИК ампициллина составили 1–8 мкг/мл, для ванкомицина – 2–64, для гентамицина – 16, для стрептомицина – 16–128, для эритромицина – 0,5–8, для тетрациклина – 1–2, для хлорамфеникола – 2–8, для клиндамицина – 1–16, для канамицина – 16–256 мкг/мл. Значения МИК ампициллина для энтерококков составили 2–8 мкг/мл, для ванкомицина – 2, для гентамицина – 16, для стрептомицина – 32–128, для эритромицина – 1–16, для тетрациклина – 2–32, для хлорамфеникола – 4–64, для клиндамицина – 8, для канамицина – 16–256 мкг/мл.

Т а б л и ц а 2. Антибиотикоустойчивость коллекционных и выделенных из самоквасных молочных продуктов штаммов молочнокислых бактерий

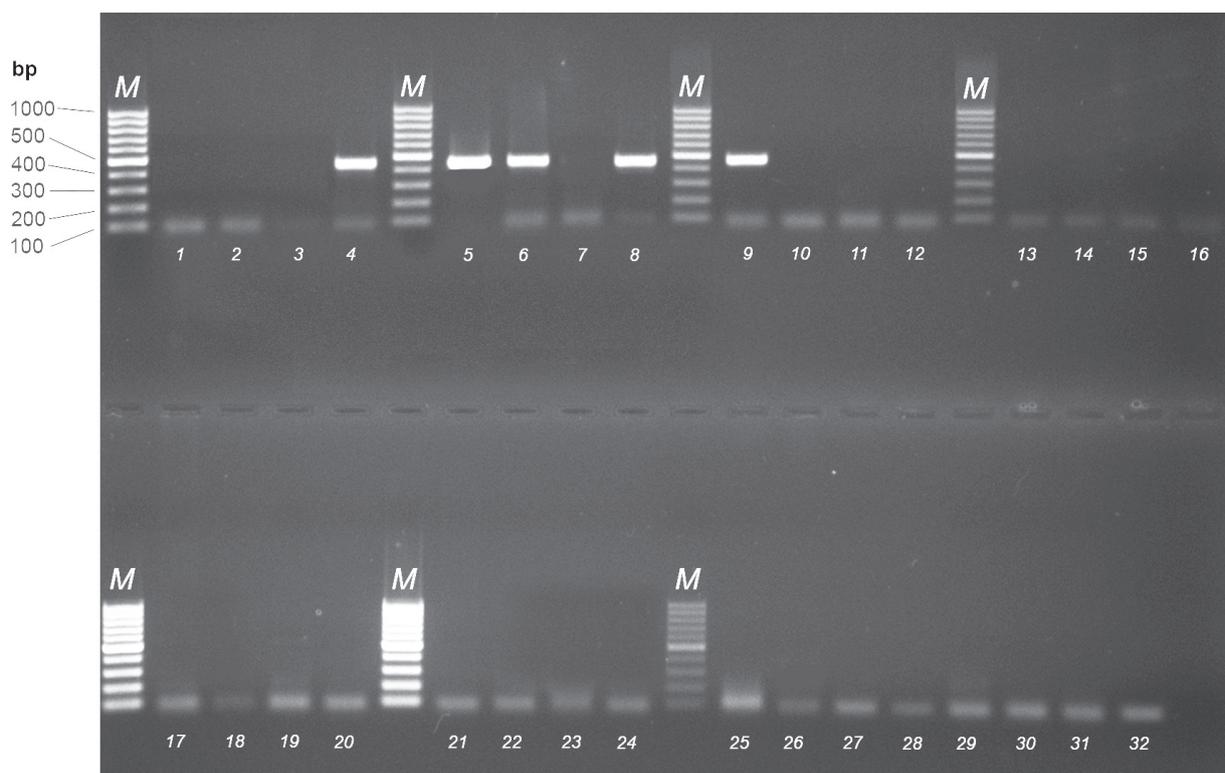
Штамм	Антибиотик (МИК), мкг/мл									
	Ap	Vm	Gm	Sm	Em	Tn	Cm	Cn	Km	Ts
<i>L. lactis</i> БИМ В-132	1	2	16	16	0,5	1	2	2	16	–
<i>E. faecium</i> БИМ В-716	8	2	16	32	4	32	64	8	256	2
<i>E. faecium</i> БИМ В-717	8	2	16	128	16	32	64	8	256	4
<i>E. faecium</i> БИМ В-718	8	2	16	128	2	32	32	8	256	4
<i>E. faecium</i> БИМ В-719	4	2	16	32	1	4	4	8	256	2
<i>E. faecium</i> БИМ В-720	8	2	16	128	4	32	64	8	256	4
<i>E. faecium</i> БИМ В-722	8	2	16	128	4	32	64	8	256	4
<i>E. faecium</i> БИМ В-529	2	2	16	32	4	2	4	8	256	4
<i>E. faecalis</i> БИМ В-1012	8	2	16	64	4	2	8	8	256	4
<i>L. lactis</i> БИМ В-424	8	64	16	128	8	2	8	2	64	–
<i>L. lactis</i> БИМ В-425	8	8	16	128	8	2	8	16	256	–
<i>L. lactis</i> БИМ В-426	2	2	16	16	0,5	2	4	16	16	–
<i>L. lactis</i> БИМ В-905	8	64	16	32	0,5	2	4	1	16	–

Штамм	Антибиотик (МИК), мкг/мл									
	Ap	Vm	Gm	Sm	Em	Tn	Cm	Cn	Km	Ts
<i>L. lactis</i> БИМ В-906	8	64	16	32	0,5	2	8	1	16	–
<i>L. lactis</i> БИМ В-907	8	64	16	32	0,5	2	4	1	16	–
<i>L. lactis</i> БИМ В-908	8	16	16	32	0,5	2	4	1	16	–
<i>L. lactis</i> БИМ В-909	8	64	16	32	0,5	2	4	1	16	–
<i>L. mesenteroides</i> БИМ В-910	8	32	16	32	0,5	2	4	1	16	–
<i>L. mesenteroides</i> БИМ В-911	8	64	16	32	0,5	2	4	2	16	–
<i>L. lactis</i> И1	8	4	16	32	0,5	2	8	1	32	–
<i>L. lactis</i> И2	8	2	16	64	0,5	2	8	2	128	–
<i>L. lactis</i> И3	8	2	16	32	0,5	2	8	1	64	–
<i>L. lactis</i> И4	8	2	16	32	0,5	2	8	2	64	–
<i>L. lactis</i> И5	8	2	16	32	0,5	2	8	2	16	–
<i>L. lactis</i> И6	8	2	16	32	0,5	2	8	2	32	–
<i>L. lactis</i> И7	8	2	16	32	0,5	2	8	2	64	–
<i>L. lactis</i> И8	8	2	16	64	0,5	2	8	2	128	–
<i>L. lactis</i> И9	8	2	16	64	0,5	2	8	2	128	–
<i>L. lactis</i> И10	8	2	16	32	0,5	2	8	1	128	–
<i>L. lactis</i> И11	8	2	16	32	0,5	2	8	2	64	–
<i>L. lactis</i> И12	8	2	16	32	0,5	2	8	2	128	–
<i>L. lactis</i> И13	8	2	16	32	0,5	2	8	2	64	–

Примечание. Ap – ампициллин, Vm – ванкомицин, Gm – гентамицин, Sm – стрептомицин, Em – эритромицин, Tn – тетрациклин, Cm – хлорамфеникол, Cn – клиндамицин, Km – канамицин, Ts – тилозин.

При разграничении анализируемых штаммов молочнокислых бактерий на устойчивые и чувствительные к соответствующему антибиотику руководствовались рекомендациями EFSA [10]. Согласно приведенным в данном документе нормам, для бактерий рода *Lactococcus* МИК ампициллина не должен превышать 2 мг/л, канамицина – 64, стрептомицина – 32, эритромицина – 1, тетрациклина – 4, хлорамфеникола – 8, ванкомицина – 4, гентамицина – 32, клиндамицина – 1 мг/л. Для бактерий рода *Leuconostoc* МИК ампициллина должен составлять не более 2 мг/л, канамицина – 16, стрептомицина – 64, эритромицина – 1, тетрациклина – 8, хлорамфеникола – 4, гентамицина – 16, клиндамицина – 1 мг/л. Для энтерококков установлены следующие значения МИК: ампициллин – 2 мг/л, канамицин – 1024, стрептомицин – 128, эритромицин – 4, тетрациклин – 4, хлорамфеникол – 16, ванкомицин – 4, гентамицин – 32, клиндамицин – 4 мг/л.

Анализ полученных результатов показал, что все исследуемые штаммы молочнокислых бактерий чувствительны к гентамицину – аминогликозидному антибиотику второго поколения. Коллекционные штаммы бактерий рода *Enterococcus* характеризовались устойчивостью к канамицину и клиндамицину, штаммы *L. lactis* БИМ В-424, БИМ В-425, И2, И4, И5, И6, И7, И8, И9, И11, И12, И13 – резистентностью к клиндамицину, *L. lactis* БИМ В-425, И2, И8, И9, И10, И12 – устойчивостью к канамицину. Штаммы *E. faecium* БИМ В-717, *L. lactis* БИМ В-424, БИМ В-425 резистентны к эритромицину, *E. faecium* БИМ В-716, БИМ В-717, БИМ В-718, БИМ В-720, БИМ В-722 – к тетрациклину и хлорамфениколу, *L. lactis* БИМ В-424, БИМ В-425, И2, И8, И9 – к стрептомицину. Все исследуемые штаммы молочнокислых бактерий, за исключением *L. lactis* БИМ В-132, БИМ В-426, *E. faecium* БИМ В-529, проявляли резистентность к ампициллину. В литературе имеются сведения о распространении среди молочнокислых бактерий, выделенных с кожных покровов и пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных, почв фермерских хозяйств, резистентности к стрептомицину, тетрациклину, ампициллину, клиндамицину, поскольку данные антибиотики широко используются в животноводстве. Молочнокислые



Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, комплементарными гену *tet(M)*, на матрице геномной ДНК коллекционных и выделенных из самоквасных молочных продуктов штаммов бактерий родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*: 1 – *L. mesenteroides* БИМ В-910; 2 – *L. mesenteroides* БИМ В-911; 3 – *E. faecium* БИМ В-529; 4 – *E. faecium* БИМ В-716; 5 – *E. faecium* БИМ В-717; 6 – *E. faecium* БИМ В-718; 7 – *E. faecium* БИМ В-719; 8 – *E. faecium* БИМ В-720; 9 – *E. faecium* БИМ В-722; 10 – *E. faecalis* БИМ В-1012; 11 – *L. lactis* БИМ В-132; 12 – *L. lactis* БИМ В-424; 13 – *L. lactis* БИМ В-425; 14 – *L. lactis* БИМ В-426; 15 – *L. lactis* БИМ В-905; 16 – *L. lactis* БИМ В-906; 17 – *L. lactis* БИМ В-907; 18 – *L. lactis* БИМ В-908; 19 – *L. lactis* БИМ В-909; 20 – *L. lactis* И1; 21 – *L. lactis* И2; 22 – *L. lactis* И3; 23 – *L. lactis* И4; 24 – *L. lactis* И5; 25 – *L. lactis* И6; 26 – *L. lactis* И7; 27 – *L. lactis* И8; 28 – *L. lactis* И9; 29 – *L. lactis* И10; 30 – *L. lactis* И11; 31 – *L. lactis* И12; 32 – *L. lactis* И13. М – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder

бактерии, изолированные из ферментированных молочных продуктов, часто проявляют устойчивость к эритромицину и тетрациклину [15]. Чувствительными к ванкомицину оказались все анализируемые штаммы бактерий рода *Enterococcus* и 14 штаммов бактерий рода *Lactococcus*, устойчивость к данному антибиотику выявлена у 7 штаммов лактококков и у 2 штаммов лейконостоков. Согласно данным литературы, резистентность к ванкомицину является отличительной особенностью представителей рода *Leuconostoc* и не характерна для бактерий рода *Lactococcus* [16]. Согласно рекомендациям EFSA, при изучении антибиотикорезистентности энтерококков помимо стандартного набора антибиотических препаратов необходимо определение устойчивости к тилозину – антибиотику, широко используемому в ветеринарии. Как показали результаты проведенного исследования, 6 из 8 тестируемых штаммов бактерий рода *Enterococcus* устойчивы к тилозину, что согласуется с данными литературы. Сравнительный анализ профилей антибиотикоустойчивости бактерий родов *Lactococcus* и *Enterococcus* показал, что представители обоих родов резистентны к ампициллину, эритромицину, клиндамицину, канамицину, устойчивость к ванкомицину и стрептомицину характерна только для лактококков, а устойчивость к тетрациклину и хлорамфениколу является отличительной особенностью энтерококков. При сравнении фенотипических профилей антибиотикорезистентности штаммов *L. lactis* установлено, что коллекционные штаммы лактококков устойчивы к более широкому спектру антибиотических препаратов по сравнению со штаммами, выделенными из самоквасных молочных продуктов. Из 32 исследуемых штаммов молочнокислых бактерий родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* лишь 2 штамма лактококков соответствовали установленным EFSA критериям безопасности по признаку антибиотикорезистентности.

На втором этапе исследований изучены генетические профили антибиотикорезистентности молочнокислых бактерий. С помощью ПЦР-тестирования с использованием праймеров, специфичных к генетическим детерминантам резистентности к антибиотикам разных классов, у штаммов *E. faecium* БИМ В-716, БИМ В-717, БИМ В-718, БИМ В-720, БИМ В-722, устойчивых к тетрациклину, обнаружен ген *tet(M)*, детерминирующий резистентность к данному препарату (см. рисунок). Согласно данным литературы, ген *tet(M)*, широко распространенный среди энтерококков, располагается на конъюгативных транспозонах типа Tn916 и Tn5397 и способен передаваться другим микроорганизмам [17, 18]. У других исследуемых штаммов бактерий родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* гены антибиотикоустойчивости *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)*, *cat(TC)* не обнаружены. Полученные результаты свидетельствуют, что фенотипическая устойчивость молочнокислых бактерий к антибиотикам не всегда обусловлена наличием трансмиссивных генетических детерминант антибиотикорезистентности, поэтому необходимо проводить мониторинг данного признака на фенотипическом и генетическом уровнях.

Заключение. Фенотипические профили антибиотикоустойчивости бактерий родов *Lactococcus* и *Enterococcus* схожи. Представители обоих родов устойчивы к ампициллину, эритромицину, клиндамицину, канамицину, чувствительны к гентамицину. Резистентность к ванкомицину и стрептомицину обнаружена у лейконостоков и нескольких штаммов лактококков, в то время как энтерококки чувствительны к данному антибиотику. Устойчивость к тилозину выявлена у 6 исследуемых штаммов энтерококков, к эритромицину – у 1 штамма энтерококков и у 2 штаммов лактококков. Резистентность к тетрациклину и хлорамфениколу, а также наличие гена *tet(M)* – характерные признаки бактерий рода *Enterococcus*. Коллекционные штаммы *Lactococcus lactis* устойчивы к более широкому спектру антибиотиков по сравнению со штаммами, выделенными из самоквасных молочных продуктов. Из 32 исследуемых штаммов бактерий родов *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* лишь 2 штамма лактококков соответствовали установленным EFSA критериям безопасности по признаку антибиотикорезистентности.

Список использованной литературы

1. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes / O. Cano-Garrido [et al.] // *Microb. Cell. Fact.* – 2015. – Vol. 14, N 1. – P. 137.
2. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: Application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas-type goat cheese / D. N. Furtado [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. – N 46. – P. 201–206.
3. Genetic characterization and expression of leucocin B, a class IId bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010 / X. Wan [et al.] // *Res. Microbiol.* – 2015. – N 166. – P. 494–503.
4. Stiles, M. E. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy / M. E. Stiles, W. H. Holzapfel // *Int. J. Food Microbiol.* – 1997. – N 36. – P. 1–29.
5. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review / C. A. van Reen [et al.] // *Arch. Microbiol.* – 2011. – N 193. – P. 157–168.
6. Mathur, S. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria: a review / S. Mathur, R. Singh // *Int. J. Food Microbiol.* – 2005. – N 105. – P. 281–295.
7. Fuller, S. Probiotics in man and animals / S. Fuller // *J. Appl. Bacteriol.* – 1989. – N 66. – P. 365–378.
8. Casewell, M. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health / M. Casewell // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2003. – N 52. – P. 159–161.
9. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. – 9th ed. – 2012. – N 32. – P. 1–88.
10. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance // *EFSA J.* – 2012. – N 10. – P. 2740–2750.
11. Antimicrobial profile of lactic acid bacteria isolated from vegetables and indigenous fermented foods of India against clinical pathogens using microdilution method / A. Patel [et al.] // *Biomed. Environ. Sci.* – 2013. – N 26. – P. 759–764.
12. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria / I. Klare [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – N 71. – P. 8982–8986.
13. Характеристика устойчивости к антибиотикам потенциальных пробиотических бактерий рода *Lactobacillus* из желудочно-кишечной микробиоты человека / С. Г. Ботина [и др.] // *Микробиология.* – 2011. – Т. 80, № 2. – С. 175–183.

14. Antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Enterococcus* spp. and *Streptococcus* spp. recovered from the indoor air of a large-scale swine-feeding operation / A. R. Sapkota [et al.] // Lett. Appl. Microbiol. – 2006. – N 43. – P. 534–540.
15. Phenotypic expression, molecular characterization and transferability of erythromycin resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from naturally fermented food / S. Thumu [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2012. – N 102. – P. 541–555.
16. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species / J. M. Swenson [et al.] // Antimicrob. Ag. Chemother. – 1990. – N 34. – P. 543–549.
17. Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and Class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soil / V. Srinivasan [et al.] // Microb. Ecol. – 2008. – N 55. – P. 184–193.
18. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria / M. A. Ammor [et al.] // Food Microbiol. – 2007. – N 24. – P. 559–570.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 597.554.3:576.08(476)

А. С. ПОЛЕТАЕВ

АНАЛИЗ КАРИОТИПОВ КАРАСЕЙ В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: viroxylan@gmail.com

Изучены такие проблемы таксономии рода *Carassius*, как вероятные причины вспышки численности серебряного карася *C. auratus* в середине XX в. и вытеснение им *C. carassius*, а также других близких видов, использование его для зарыбления водных объектов Беларуси, наличие у *C. auratus* форм с различным кариотипом, на основании чего сделаны выводы об актуальности проведения кариологических исследований карасей в Беларуси.

Ключевые слова: *Carassius carassius*, *Carassius auratus*, *Carassius gibelio*, карась золотой, карась серебряный, кариотип, диплоиды, триплоиды, вытеснение видов.

A. POLETAEV

ANALYSIS OF *CARASSIUS* KARYOTYPES IN BELARUS

Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: viroxylan@gmail.com

This article is a review of taxonomic problems of genus *Carassius*, possible causes of explosive-like increase in the number of goldfish *C. auratus* in the middle of 20th century, replacement of the crucian carp *C. carassius* and other close-related species by the goldfish, its use for stocking Belarusian waters, existence of different-karyotyped forms of *C. auratus*, and the importance of carrying out the karyologic research of *Carassius* in Belarus.

Keywords: *Carassius carassius*, *Carassius auratus*, *Carassius gibelio*, crucian carp, goldfish, gibel carp, karyotype, diploids, triploids, species replacement.

Рыбы рода *Carassius* Nilsson, 1832 как в Беларуси, так и в других странах неоднократно становились объектами различных исследований. Одним из аспектов этих исследований являлось определение кариотипа карасей, что связано с довольно сложной организацией последнего. В основном эти исследования проводились в России, Китае, Польше, Чехии и некоторых других странах, упоминаний о подобных исследованиях в Беларуси не отмечено.

Цель данной статьи – анализ кариологических исследований карасей в Беларуси.

Вопрос видовой принадлежности обитающих в водных объектах Беларуси карасей достаточно сложен. Ранее считалось, что на территории нашей страны обитает два вида этого рода: золотой (обыкновенный) карась *C. carassius* и серебряный карась *C. auratus*, из нескольких подвидов которого для Беларуси указывался *C. a. gibelio* [1]. Однако в последнее время серебряный карась чаще рассматривается не как единый вид, а как комплекс видов, включающий собственно *C. auratus*, а также *C. gibelio* и *C. langsdorfii*, которые ранее имели статус подвидов [2]. В Европе широко распространены *C. auratus* и *C. gibelio*, оба эти вида встречаются и в Беларуси [3–5]. В связи с вышеперечисленными таксономическими проблемами, а также с тем, что особенности распространения *C. auratus* и *C. gibelio* в Беларуси неизвестны, далее в статье название «серебряный карась» будет использоваться для обозначения всех видов комплекса *C. auratus* без уточнения видовой принадлежности.

Во второй половине XX в. в большом количестве водных объектов отмечалась вспышка численности серебряного карася [6]. До этого он был зарегистрирован во многих европейских странах,

однако в численности значительно уступал аборигенному золотому карасю. Убедительным выглядит предположение о связи этого явления с начавшейся с 1930-х годов акклиматизацией в европейской части СССР амурского серебряного карася для использования в качестве добавочной рыбы в прудовых хозяйствах, а также для зарыбления водохранилищ и дистрофных озер [6]. В частности, в Беларусь его завозили в 1948–1949 гг. как напрямую с Дальнего Востока, так и из Саввинского рыбопитомника (Московская обл. России). Посадочный материал из него представлял собой потомство гиногенетической самки амурского карася, икра которой была осеменена спермой сазана [6]. К началу 1960 г. надежды на увеличение продуктивности водоемов за счет карася не оправдались, и в 1961 г. прудовые хозяйства резко ограничили зарыбление им водоемов. К этому времени серебряный карась в большом количестве размножился во всех ранее зарыбленных им прудах, связанных с ними каналах и других расположенных поблизости водных объектах и начал стихийное расселение по естественным водоемам, после чего резко увеличилась его численность [6]. Схожие явления отмечались и в других странах, в водоемы которых был вселен амурский карась, в частности в странах Прибалтики, в Украине, Молдове, Казахстане и Средней Азии, а также в европейской части России [6]. Экологически амурский серебряный карась сильно отличается от европейского: в естественном ареале это речная рыба, которая после акклиматизации может заселять новые биотопы (в которых ранее не встречалась) – водотоки, крупные озера и водохранилища и даже предустьевые участки морей [6]. Амурский карась более конкурентоспособен, чем европейские формы, и может достигать значительно большей численности и биомассы [6].

Установлено, что при попадании в новые для себя водоемы серебряный карась при благоприятных условиях сильно влияет на ихтиофауну, массово размножаясь и подавляя численность других видов рыб [6]. Во многом это обусловлено наличием у серебряного карася двух форм: двуполой амфимиктической и однополой гиногенетической, на которой следует остановиться подробнее. Популяции данной формы серебряного карася состоят исключительно из самок; самцы если и встречаются, то очень редко. Икру в этом случае осеменяют самцы других видов карповых рыб, при этом потомство не несет никаких признаков их видов [1]. Таким образом, их генетический материал расходуется на воспроизводство не собственного вида, а чужеродного серебряного карася. В частности, показано, что амурский серебряный карась при попадании в водоемы, населенные золотым карасем, за короткий срок вытесняет последнего, а возможно, также и местную форму серебряного карася, однако из-за их сильного морфологического сходства установить это довольно сложно [6]. Известны также случаи, когда соотношение полов в популяциях карася существенно менялось за короткий срок. В частности, в бессамцовых популяциях появлялись самцы, а также гермафродитные особи [1, 6, 7]. М. И. Абраменко [7] отмечает, что переход от одной формы к другой является обратимым процессом, и предполагает, что это необходимо для саморегуляции численности и предотвращения вырождения в карликовую тугорослую форму.

Способность серебряного карася к гибридизации с близкими видами рыб также способствует их вытеснению. Показано, что он может образовывать жизнеспособные гибриды с золотым карасем и карпом *Cyprinus carpio* [8, 9]. При этом генофонд вышеназванных видов постепенно растворяется в генофонде серебряного карася из-за превосходящей численности последнего. Это явление отмечено в различных странах, в том числе в Беларуси [6, 8, 10]. В последние годы наблюдается снижение численности золотого карася и сокращение области его распространения; в большинстве водоемов, в которых ранее обитали оба вида, в уловах присутствует только серебряный карась [10]. Основными причинами такого замещения считаются появление многочисленных самцов *C. auratus* в популяциях, гибридизация его с золотым карасем, а также большая экологическая пластичность *C. auratus* [10]. Этому процессу способствуют также миграции серебряного карася, перевозка его из водоема в водоем рыбаками-любителями при использовании в качестве живца и исчезновение небольших заболоченных водоемов – типичных мест обитания карася золотого [10].

В Беларуси карась серебряный массово используется для зарыбления водоемов. Так, в период с 2001 по 2010 г. в естественные водоемы Беларуси было вселено 6428,2 тыс. шт. посадочного материала этого вида [11]. Вылов его достаточно велик, однако в большинстве случаев наблюдается

четкая зависимость между объемами зарыбления и вылова, т. е. чем большим количеством карася зарыблен водоем, тем больше его вылавливается [11]. Исключение составляет Гомельская область, но 86 % объема вылова этого вида из водоемов области (и более трети из всех водоемов страны) приходится на оз. Червоное, объем зарыбления которого составляет всего около 5 % от общего объема зарыбления серебряным карасем водоемов Беларуси [11]. Это указывает на значительно более низкую эффективность зарыбления данным видом большинства водоемов страны. Кроме оз. Червоное существуют и другие аналогичные водоемы, где серебряный карась достиг высокой численности, преимущественно это неглубокие высокоэвтрофные озера [11]. По-видимому, зарыблять этим видом карасей такие водоемы наиболее целесообразно, учитывая наличие в таких водоемах и связанных с ними водных объектах золотого карася.

Популяции серебряного карася также различаются по плоидности особей. Следует отметить, что для рода *Carassius* характерна амфидиплоидность, следовательно, формы, обычно называемые в литературе диплоидными и триплоидными, на самом деле имеют тетра- и гексаплоидную структуру генома [12]. В целом же серебряный карась даже в небольшой части ареала может быть представлен значительным количеством клоновых форм с неодинаковыми биологическими особенностями, которые достоверно не отличаются по морфологическим признакам [12, 13]. Чаще всего диплоидные формы рассматриваются как амфимиктические, а триплоидные – как гиногенетические [1, 6]. Однако предполагается также существование диплоидных гиногенетических форм [6]. Кроме того, есть данные о том, что при гиногенетическом размножении карасей возможны инкорпорация в геном самки части генома самца, что может приводить к появлению рекомбинантных особей, а также оплодотворение триплоидной яйцеклетки с образованием тетраплоидной особи [13, 14]. Результаты анализа митохондриальной ДНК различных форм *C. auratus* также свидетельствуют о происходящем между разными формами генетическим обменом. Согласно полученным данным, этот обмен является однонаправленным, т. е. переход от амфимиктической формы к гиногенетической возможен, а в обратном направлении – маловероятен, а скорее всего, полностью исключен [14]. Есть основания предполагать, что этот процесс носит адаптивный характер, так как имеются данные о появлении при неблагоприятных условиях даже в полностью гиногенетических популяциях тугорослых форм, среди которых имеются самцы [14]. Предположительно, переход от триплоидной формы к диплоидной происходит через промежуточную тетраплоидную стадию. Таким образом, для надежного определения принадлежности карася к определенному виду или форме нужно использовать иные методы, например кариотипирование.

В нынешних условиях кариотипирование карасей представляется целесообразным для решения нескольких задач, таких как изучение структуры комплекса *C. auratus* наших водных объектов, выявление гибридных и рекомбинантных форм, а также чистокровного золотого карася, установление связей между генетическими и биологическими особенностями карасей. Отдельно следует отметить необходимость изучения популяций серебряного карася рыбных хозяйств и других водоемов, служащих источником материала для зарыбления естественных водных объектов. Для предотвращения вытеснения им аборигенных видов рыб следует избегать зарыбления теми формами серебряного карася, безопасность которых в этом отношении не подтверждена. Таким образом, кариологические исследования карасей Беларуси представляются перспективными для сохранения биоразнообразия нашей страны.

Список использованной литературы

1. Жуков, П. И. Справочник по экологии пресноводных рыб / П. И. Жуков. – Минск, 1988.
2. Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia / M. Takada [et al.] // BMC Evolutionary Biology [Electronic resource]. – 2010. – 10:7. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2148-10-7.pdf>. – Date of access: 25.10.2015.
3. Freyhof, J. Fauna Europaea: *Carassius* / J. Freyhof, N. Bailly // Fauna Europaea version 2.6.2 [Electronic resource]. – 2013. – Mode of access: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=304426. – Date of access: 24.10.2015.
4. Freyhof, J. Fauna Europaea: *Carassius gibelio* / J. Freyhof, N. Bailly // Fauna Europaea version 2.6.2 [Electronic resource]. – 2013. – Mode of access: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=304429. – Date of access: 24.10.2015.

5. *Freyhof, J.* Fauna Europaea: *Carassius auratus* / J. Freyhof, N. Bailly // Fauna Europaea version 2.6.2 [Electronic resource]. – 2013. – Mode of access: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=304427. – Date of access: 24.10.2015.
6. *Подушка, С. Б.* О причинах вспышки численности серебряного карася / С. Б. Подушка // Науч.-техн. бюл. лаборатории ихтиологии ИНЭНКО. – 2004. – № 8. – С. 5–15.
7. *Абраменко, М. И.* Адаптивные механизмы распространения и динамики численности *Carassius auratus gibelio* в Понто-Каспийском регионе (на примере Азовского бассейна) / М. И. Абраменко // Рос. журн. биол. инвазий. – 2011. – № 2. – С. 3–27.
8. *Smartt, J.* A possible genetic basis for species replacement: preliminary results of interspecific hybridisation between native crucian carp *Carassius carassius* (L.) and introduced goldfish *Carassius auratus* (L.) / J. Smartt // Aquatic Invasions. – 2007. – Vol. 2. – P. 59–62.
9. A molecular approach to detect hybridisation between crucian carp (*Carassius carassius*) and non indigenous carp species (*Carassius auratus* and *Cyprinus carpio*) in UK waters, including a consideration of the taxonomic status of gibel carp (*Carassius spp.*): R&D technical report / University of Hull; B. Hanfling, R. Harley. – Bristol, 2003. – 38 p. – N W2-077/TR.
10. Рекомендации по сохранению карася золотого *Carassius carassius* (L.) в естественных водоемах Беларуси / В. К. Ризевский [и др.]. – Минск, 2013. – С. 3–11.
11. Рекомендации по зарыблению естественных водоемов Беларуси серебряным карасем *Carassius auratus gibelio* (Bloch) / В. К. Ризевский [и др.]. – Минск, 2013. – С. 3–11.
12. *Межжерин, С. В.* Морфологическая изменчивость и дифференциация китайского, *Carassius auratus*, и серебряного, *C. gibelio*, карасей (Сургиниформес, Сургиниде) в водоемах Украины / С. В. Межжерин, С. В. Кокодий // Вестн. зоологии. – 2009. – Вып. 43 (1). – С. 39–50.
13. *Межжерин, С. В.* Поликлоновая структура европейских серебряных карасей *Carassius auratus s. lato* в водоемах Украины / С. В. Межжерин, С. В. Кокодий // Доповіді Нац. Акад. наук України. – 2008. – № 7. – С. 162–169.
14. *Апаликова, О. В.* Филогенетический анализ двух форм серебряного карася *Carassius auratus gibelio* Bloch на основе изменчивости митохондриальной ДНК: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О. В. Апаликова. – Владивосток, 2008. – 24 с.

Поступила в редакцию 30.10.2015

УДК 577.352.332:546.47:612.111

А. С. СКОРОБОГАТОВА

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИОНОВ АЛЮМИНИЯ НА ЭРИТРОЦИТЫ ЧЕЛОВЕКА

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: Sas.alesya@gmail.com*

Установлено, что способность эритроцитов накапливать алюминий дозозависимым образом приводит к нарастанию окислительных процессов в клетках, снижению активности ферментов антиоксидантной системы, изменению физического состояния липидов на различной глубине мембраны и сглаживанию микрорельефа наружной части мембраны клеток. Исследования *in vivo* показали, что соотношение концентраций алюминия и кальция в волосах (Ca/Al) является прогностическим критерием, позволяющим оценить воздействие ионов алюминия на организм человека.

Ключевые слова: эритроцитарные мембраны, микровязкость, ионы алюминия.

A. SKOROBHATOVA

ALUMINUM EFFECTS ON HUMAN ERYTHROCYTES

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: Sas.alesya@gmail.com*

It was shown that dose-depending aluminum accumulation in erythrocytes leads to aggravating of oxidative process in cells, decreasing activity of antioxidant enzymes, changing of lipids physical state on different depth of membrane and smoothing of microrelief of outer part of cell membrane. *In vivo* investigation revealed necessity of evaluation coefficient of relation concentration of aluminum and calcium (Ca/Al) in hair as prognostic index of aluminum ions influence on human organism.

Keywords: erythrocyte membrane, microviscosity, aluminum ions.

Введение. Большое количество теоретических и экспериментальных данных о влиянии алюминия на различные аспекты жизнедеятельности организмов позволяет предположить, что он принимает участие в развитии ряда патологий [1].

Цель данной работы – выявить возможные эффекты действия ионов алюминия на эритроциты человека *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы исследования. В работе использованы образцы крови 65 здоровых доноров в консерванте «гепарин», полученные из ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ, а также образцы волос и крови с различной степенью нагрузки алюминием, полученных из БелМАПО, у 27 практически здоровых лиц в возрасте 27–54 лет.

Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования при 2000 g в течение 5 мин и трижды отмывали в 155 mM NaCl. Мембраны эритроцитов выделяли по методу Доджа и сотр. [2]. Нагрузку эритроцитов ионами алюминия проводили путем инкубации суспензии клеток с субгемолитическими концентрациями хлорида алюминия – 2,7–27 мг/л в забуференном растворе NaCl в течение 3 ч при 37 °С. Концентрацию алюминия в эритроцитах измеряли с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой (Shimadzu, Япония). Генерацию активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA) по интенсивности флуоресценции конечного продукта [3]. Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по методу [4].

Изменение микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов оценивали с помощью липофильных флуоресцентных зондов 1-(4-триметиламмонийфенил)-6-фенил-1,3,5-гексатриена (ТМА-ДФГ) [5], 2-диметиламино-6-лауроилнафталина (лаурдана) [6] и пирена [7]. Активность глутатионпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрически. Для исследования микрорельефа поверхности мембраны эритроцитов применяли атомно-силовую микроскопию (АСМ) (NT-206 ОДО «Микротестмашины», Беларусь, зонды МикроМаш). Исследование содержания в волосах алюминия и кальция проведено методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (Vista PRO (Varian, США)).

Для анализа результатов экспериментов (6–12) применяли метод вариационной статистики с использованием параметрического критерия ANOVA (однофакторный дисперсионный анализ) и последующего теста Ньюмана–Кейлса [8].

Результаты и их обсуждение. В настоящей работе нами изучена возможность накопления ионов алюминия клетками крови при их *in vitro* инкубации в среде, содержащей хлорид алюминия в концентрации 2,7–27 мг/л. Показано, что концентрация Al^{3+} в контрольных эритроцитах колебалась в диапазоне от 0 (у 6 из 12 доноров) до 3,95 мг/л (у 1 донора). Выявленные индивидуальные различия контрольных значений могут быть обусловлены разными образом жизни, привычками питания, а также возрастом доноров. Статистически достоверное увеличение концентрации ионов алюминия в эритроцитах обнаружено уже после инкубации их с 2,7 мг/л $AlCl_3$ ($p < 0,01$) [9].

Для оценки внутриклеточных процессов генерации АФК нами использован флуоресцентный зонд CM-H₂DCFDA, который чувствителен ко многим формам АФК [3]. Обнаружено, что в исследуемых концентрациях хлорид алюминия вызывает увеличение уровня интенсивности флуоресценции зонда в эритроцитах на 50–80 % по сравнению с контролем. Для выяснения влияния нарастания пула АФК на окислительные процессы в клетках определяли уровень продуктов ПОЛ в эритроцитах, предварительно проинкубированных в средах, содержащих от 2,7 до 27 мг/л хлорида алюминия. Показано, что 3-часовая инкубация эритроцитов в среде, содержащей хлорид алюминия, приводит к увеличению уровня в клетках малонового диальдегида максимально на 40 % [10].

Одновременно с этим нами изучена активность ферментов антиоксидантной системы в клетках, подвергшихся воздействию $AlCl_3$ (СОД, каталаза и глутатионпероксидаза). В эритроцитах, подвергшихся воздействию 20,25–27 мг/л хлорида алюминия, обнаружено достоверное снижение активности каталазы по сравнению с контролем (максимально на 25 %), а также небольшое, но достоверное снижение активности СОД и глутатионпероксидазы (на 5–15 %) при воздействии 27 мг/л хлорида алюминия по сравнению с контролем [10].

Об изменении физико-химических свойств мембраны эритроцитов при воздействии хлорида алюминия судили по изменению параметров флуоресценции липофильных зондов (лаурдана, ТМА-ДФГ и пирена).

Установлено, что инкубация эритроцитов в среде, содержащей 20,25 и 27 мг/л хлорида алюминия, приводит к снижению (по сравнению с контролем) степени поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембрану, в среднем на 12 %, что указывает на снижение микровязкости липидов бислоя мембраны. При этом обнаружено достоверное увеличение генерализованной поляризации лаурдана, встроенного в мембраны эритроцитов, после воздействия на клетки 13,5; 20,25 и 27 мг/л хлорида алюминия максимально на 20 %, что отражает снижение полярности в области расположения молекул зонда. Снижение микровязкости липидов в мембранах эритроцитов, происходящее при воздействии 13,5–27 мг/л хлорида алюминия, соответствует обнаруженному увеличению коэффициента эксимеризации пирена [9, 10].

С помощью АСМ исследована топография поверхности мембраны эритроцитов, подвергшихся воздействию хлорида алюминия в концентрации 27 мг/л. На рис. 1 видно, что после воздействия 27 мг/л хлорида алюминия мембрана эритроцитов становится более гладкой, чем в контрольной клетке. Выявленные с помощью АСМ изменения не являются специфическими для алюминия, так как аналогичные данные получены нами и для ионов цинка, что связано с модификацией структурного состояния белковых компонентов [12]. Вклад белковых компонентов

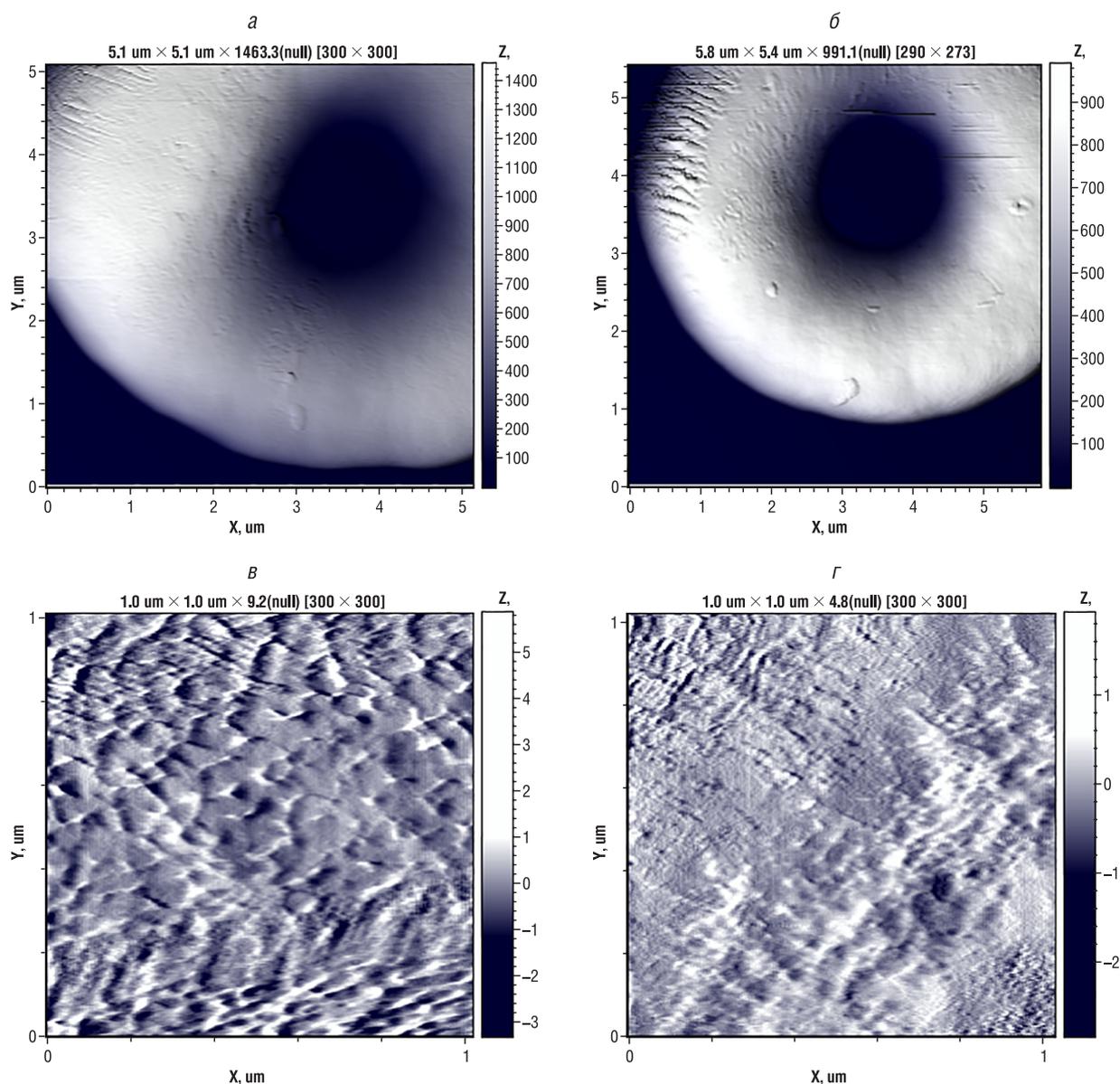


Рис. 1. АСМ-изображение тонкой структуры мембраны эритроцитов человека: эритроцитов до (а) и после (б) воздействия AlCl_3 рельефа наружной части эритроцитарной мембраны до (в) и после (г) воздействия 27 мг/л AlCl_3

не исключен и в данном случае, так как нами выявлено достоверное снижение выхода конъюгатов глутатиона в эритроцитах, обработанных хлоридом алюминия в концентрации 27 мг/л [10].

Учитывая данные, полученные нами в экспериментах *in vitro*, предпринята попытка установить связь между структурным состоянием мембран эритроцитов *in vivo* и содержанием алюминия в волосах. За средний биологически допустимый уровень концентрации алюминия в волосах взято значение 1–10 мкг/г [12]. При анализе результаты измерений разделили на две группы соответственно уровню содержания алюминия в волосах: 1-я группа – 5,30–8,64 мкг/г (среднее – $7,7 \pm 0,35$ мкг/г), 2-я группа – 9,89–18,5 мкг/г (среднее – $14,4 \pm 0,76$ мкг/г).

Известно, что наиболее активным антагонистом алюминия является кальций. Исследуя их соотношение (Ca/Al), можно определить степень нарушения биохимических процессов при воздействии алюминия. Обнаружено, что показатель Ca/Al статистически значимо ($p < 0,05$) снижен во 2-й группе. Оценка структурно-функционального состояния мембран эритроцитов выявила достоверное ($p = 0,025$) увеличение генерализованной поляризации флуоресценции лаурдана у обследованных при повышении содержания алюминия в волосах. Для ТМА-ДФГ и пирена

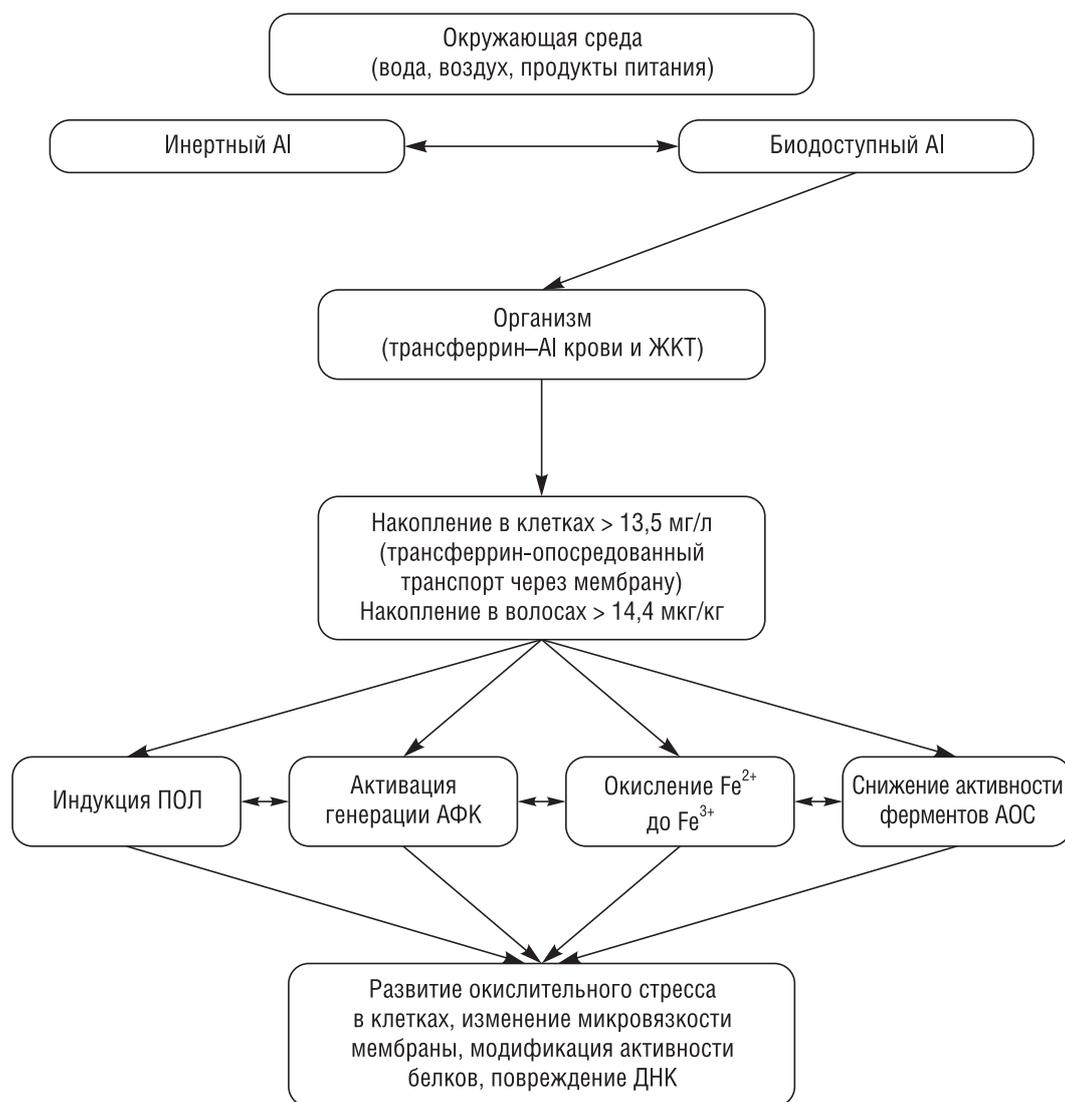


Рис. 2. Схема токсического действия алюминия на организм человека

изменения констатированы лишь на уровне тенденций. Также установлено, что в группе лиц со значением Ca/Al ниже физиологической нормы данный коэффициент достоверно и положительно коррелирует с показателем поляризации флуоресценции лаурдана ($r = 0,92$; $p = 0,027$) [13].

Полученные нами результаты и данные литературы наглядно демонстрируют важность знаний о механизмах и способах развития токсического воздействия алюминия на организм человека. Представляется важным определить так называемую «лимитирующую концентрацию» содержания алюминия, при которой происходит запуск патологических процессов как в отдельных клетках, так и во всем организме человека [13].

На рис. 2 приведена возможная схема токсического воздействия алюминия на организм человека, основанная на анализируемых литературных данных, а также вышеприведенных результатах собственного исследования. Из рис. 2 видно, что основным механизмом токсического действия алюминия является окислительный стресс, который опосредуется сразу несколькими реакциями.

Заключение. По результатам проведенного нами исследования можно сделать вывод, что накопление алюминия до 13,5 мг/л и выше в клетках крови или 14,4 мкг/г в волосах и является «лимитирующей концентрацией», запускающей развитие вызванного им окислительного стресса в клетке.

Список использованной литературы

1. IPCS. Aluminum Environmental Health Criteria 194. – Geneva: World Health Organization, 1997. – 417 p.
2. *Dodge, G. T.* The preparation and chemical characteristic of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes / G. T. Dodge, C. Mitchell, D. J. Hanahan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1963. – Vol. 100. – P. 119–130.
3. *Sharman, W. M.* Role of activated oxygen species in photodynamic therapy / W. M. Sharman, C. M. Allen, J. E. Van Lier // *Meth. in Enzymol.* – 2000. – Vol. 319. – P. 376–400.
4. *Strauss, R. G.* Malonaldehyde formation is not a suitable screening test to detect oxidation in human neutrophils / R. G. Strauss // *J. Clin. Pathol.* – 1988. – Vol. 34. – P. 800–802.
5. TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells / J. G. Kuhry [et al.] // *Cell Biophys.* – 1983. – Vol. 5, N 2. – P. 129–140.
6. Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by laurdan fluorescence / T. Parasassi [et al.] // *Biophys. J.* – 1994. – Vol. 66, N 1. – P. 120–132.
7. *Galla, H. J.* Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes / H. J. Galla, E. Sackmann // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – Vol. 339. – P. 103–115.
8. *Гланц, С.* Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
9. *Лукьяненко, Л. М.* Влияние алюминия на биофизические параметры мембран эритроцитов / Л. М. Лукьяненко, А. С. Скоробогатова, Е. И. Слобожанина // *Вест. НАН Беларуси. Сер. біял. навук.* – 2010. – № 2. – С. 52–57.
10. In vitro effect of AlCl₃ on human erythrocytes: changes in membrane morphology and functionality / L. M. Lukyanenko [et al.] // *J. of trace elements in medicine and biology.* – 2013. – Vol. 27. – P. 160–167.
11. Исследование оптических и наноструктурных металлиндуцированных изменений эритроцитарных мембран методами рассеяния и атомно-силовой микроскопии / А. Я. Хайруллина [и др.] // *Оптика и спектроскопия.* – 2011. – Т. 110, № 4. – С. 574–580.
12. *Скальный, А. В.* Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков. – М.: ОНИКС 21 век, 2004. – С. 181–186.
13. *Гресь, Н. А.* Элементоз избытка алюминия / Н. А. Гресь, Е. И. Слобожанина, Е. Гузик. – Lambert Academic Publishing, 2014. – С. 78–84.

Поступила в редакцию 26.04.2016

УДК 579.222+661.185

М. С. ЧИРИКОВА

ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ ЖИРОВЫХ ВЕЩЕСТВ НА БИОЦЕНОЗ АКТИВНОГО ИЛА

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: margarita.chirikova@mail.ru*

Изучено влияние микроорганизмов-деструкторов, составляющих основу препарата Антойл, на численность основных эколого-трофических групп бактерий активного ила, а также на состав и окислительный потенциал биоценоза последнего. Установлено, что эти микроорганизмы – деструкторы жировых веществ не оказывают отрицательного влияния на развитие и состав биоценоза активного ила, способствуют улучшению его качества и повышению окислительной способности. Это позволяет использовать данный препарат для интенсификации очистки сточных вод от жировых веществ в условиях биологических очистных сооружений, работающих с активным илом.

Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы, жировые вещества, сточные воды, активный ил.

M. S. CHYRYKOVA

EFFECT MICROBIAL CULTURES DEGRADING LIPID COMPOUNDS ON BIOCENOSIS OF ACTIVATED SLUDGE

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: margarita.chirikova@mail.ru*

The impact of microbial degraders-active constituents of Antoil biopreparation introduced in to activated sludge on population of its major ecologo-trophical bacterial groups and on composition, development and oxidation potential of sludge biocenosis was studied. It was found that supply of microbial lipid degraders – ingredients of Antoil did not make-up of sludge biocenosis, upgraded its quality and oxidation capacity, allowing thereby to intensify disposal of lipid pollutants in municipal sewage treated at biological decontamination facilities operating with activated sludge.

Keywords: microorganisms-destructors, fatty substances, wastewater, activated sludge.

Введение. В настоящее время экологизация процессов очистки сточных вод от жировых веществ является одной из актуальных проблем. В Республике Беларусь функционирует более 80 предприятий мясной и молочной промышленности, которые ежегодно сбрасывают 10–12 млн м³ жиросодержащих сточных вод [1]. На очистных станциях аэрации бытовые сточные воды и стоки предприятий пищевой промышленности, содержащие различные жиры и масла растительного и животного происхождения, очищаются от указанных веществ только механическим способом, что в дальнейшем создает проблему захоронения собранных жировых отходов [2, 3]. Использование физико-химических методов очистки жиросодержащих сточных вод требует применения химических реагентов, что в свою очередь может приводить к вторичному загрязнению окружающей среды [4, 5]. В связи с этим возрастает роль биологической очистки жиросодержащих сточных вод с помощью биопрепаратов на основе микроорганизмов – деструкторов жиров и масел. Несмотря на постоянно осуществляемые в мире разработки, свидетельствующие о перспективности использования микроорганизмов – деструкторов жиров и масел при очистке сточных вод от жировых веществ, до настоящего времени влияние таких микроорганизмов на состав и развитие биоценоза активного ила (АИ) изучено недостаточно. Ранее нами разработан микробный препарат Антойл, который способствует эффективной очистке сточных вод от жировых веществ [6].

Цель настоящего исследования – изучение влияния микроорганизмов-деструкторов, составляющих основу препарата Антойл, на численность бактерий основных эколого-трофических групп в активном иле, а также на состав и окислительный потенциал биоценоза последнего.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили организмы биоценоза АИ биологических очистных сооружений (БОС) КУП «Копыльское ЖКХ».

Процесс стабилизации численности бактерий АИ при внесении препарата изучали в лабораторных условиях. Норма внесения микробного препарата на 1 м^3 сточных вод составляла 0,5 л. Титр препарата – $3,4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Учет численности микроорганизмов различных эколого-трофических групп производили методом предельных разведений и последующего высева на электропитательные среды. Микроорганизмы, усваивающие минеральные формы азота, а также актиномицеты, учитывали на крахмало-аммиачном агаре (КАА). Споробразующие бактерии выявляли на мясо-суловом агаре (МСА). Количество деструкторов жировых веществ определяли на минеральной среде Е-8, содержащей в качестве источника жировых веществ подсолнечное масло в концентрации 0,1 об. %.

Наработку микробного препарата Антойл осуществляли в условиях Биотехнологического центра Института микробиологии НАН Беларуси в ферментере LiFlus SP 300L. Титр жизнеспособных клеток в готовом препарате составил $2,4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Влияние микроорганизмов-деструкторов на биоценоз АИ изучали при производственных испытаниях препарата Антойл на БОС КУП «Копыльское ЖКХ», куда поступали стоки ОАО «Копыльский маслосырзавод».

Гидробиологический анализ АИ осуществляли при микроскопировании методом «откалиброванной капли» [7].

Результаты и их обсуждение. При исследовании процесса стабилизации численности бактерий АИ в качестве индикаторных использовали группу споробразующих микроорганизмов, способных к проведению самого широкого круга трансформационных преобразований органических веществ. С аналогичной целью использовали показатели численности актиномицетов. Микроорганизмы, развивающиеся на синтетической питательной среде, содержащей в качестве источника жировых веществ подсолнечное масло в концентрации 0,1 об. %, считали аборигенными микроорганизмами – деструкторами жиров и масел и микроорганизмами, внесенными в составе препарата Антойл.

Численность споробразующих микроорганизмов в АИ до внесения препарата составила $2,2 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл, сразу после внесения – $4,3 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. Анализ динамики численности споробразующих бактерий в АИ показал, что наиболее активный рост микроорганизмы проявили в первые 2 сут после внесения препарата. При этом титр увеличился в 11,6 раза и составил $5,0 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл при исходном $4,3 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. В последующие 2 недели наблюдалось постепенное снижение количества споробразующих микроорганизмов и установление их численности на постоянном уровне (рис. 1, а).

Количество микроорганизмов, усваивающих минеральные формы азота, а также актиномицетов в АИ БОС КУП «Копыльское ЖКХ» до внесения

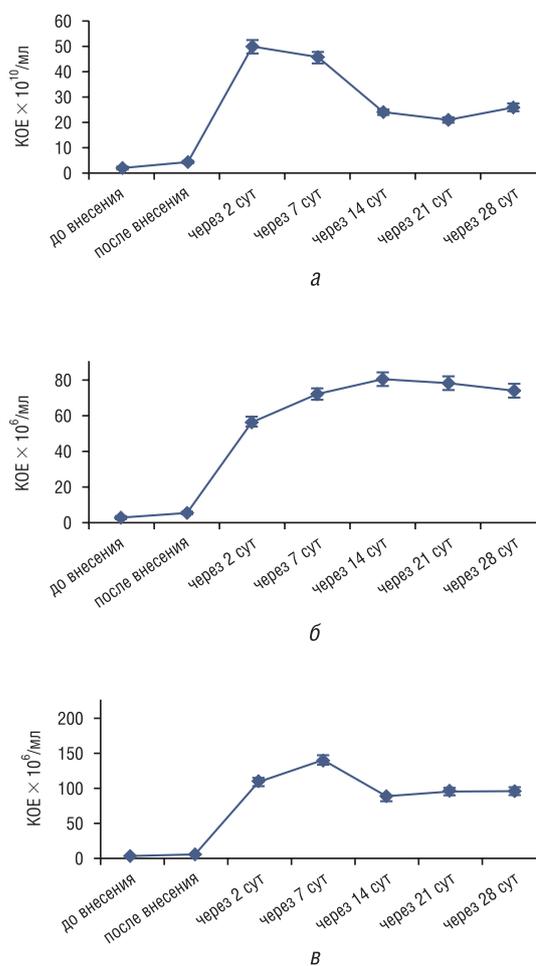


Рис. 1. Динамика численности бактерий активного ила при внесении препарата Антойл: а – споробразующие микроорганизмы; б – актинобактерии; в – микроорганизмы – деструкторы жировых веществ

препарата составляло $2,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, после внесения – $5,4 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Динамика численности микроорганизмов исследуемой группы показала, что количество их возрастало на протяжении 14 сут после внесения препарата. Наибольшее их количество наблюдалось в первые 2 сут и составляло $5,6 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. На 14-е сутки после внесения численность микроорганизмов достигла $8,0 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. На протяжении последующих 2 недель наблюдений значение титра установилось на одинаковом уровне и составило в среднем $7,6 \cdot 10^7$ КОЕ/мл (рис. 1, б).

Наиболее показательно проявилась тенденция роста микроорганизмов – деструкторов жировых веществ в АИ. Исходная численность аборигенных микроорганизмов – потенциальных деструкторов жировых веществ в АИ составила $2,1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. После внесения препарата количество деструкторов составило $4,9 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В процессе исследования общая численность внесенных и аборигенных микроорганизмов – деструкторов жировых веществ через 2 сут после добавления препарата в АИ увеличилась от $4,9 \cdot 10^5$ до $1,1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Максимальная численность микроорганизмов-деструкторов, зарегистрированная на 7-е сутки проведения эксперимента, составила $1,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Однако на 14-е сутки количество бактерий в составе АИ снизилось до титра $8,7 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Достигнутая численность бактерий-деструкторов стабильно сохранялась на протяжении 2 недель (рис. 1, в).

Полученные данные могут служить основанием для рекомендации внесения препарата Антойл в аэротенк БОС КУП «Копыльское ЖКХ» партиями с интервалом в 2 недели.

Процесс очистки городских сточных вод от жировых веществ определяется влиянием микроорганизмов-деструкторов на состав и структуру биоценоза АИ, в котором микроорганизмы, составляющие препарат, должны стабилизировать свой количественный состав и метаболическую активность. Для изучения влияния микроорганизмов – деструкторов жировых веществ, составляющих основу препарата Антойл, на состав и развитие биоценоза АИ проведен его гидробиологический анализ до внесения препарата и через 7 мес. после внесения.

При проведении гидробиологического анализа до внесения препарата визуально установлено наличие в составе ила мелких, достаточно рыхлых хлопьев. Такое состояние хлопьев ила характерно для сточных вод с большой нагрузкой по органике. В составе биоценоза свободноплавающего АИ отмечается наличие раковинных амёб, приуроченных к хлопьям АИ (рис. 2, а), большое количество мелких и крупных жгутиконосцев (рис. 2, б), развитие которых свидетельствует о высоких нагрузках на активный ил и низком содержании кислорода. Обнаружены брюхорес-

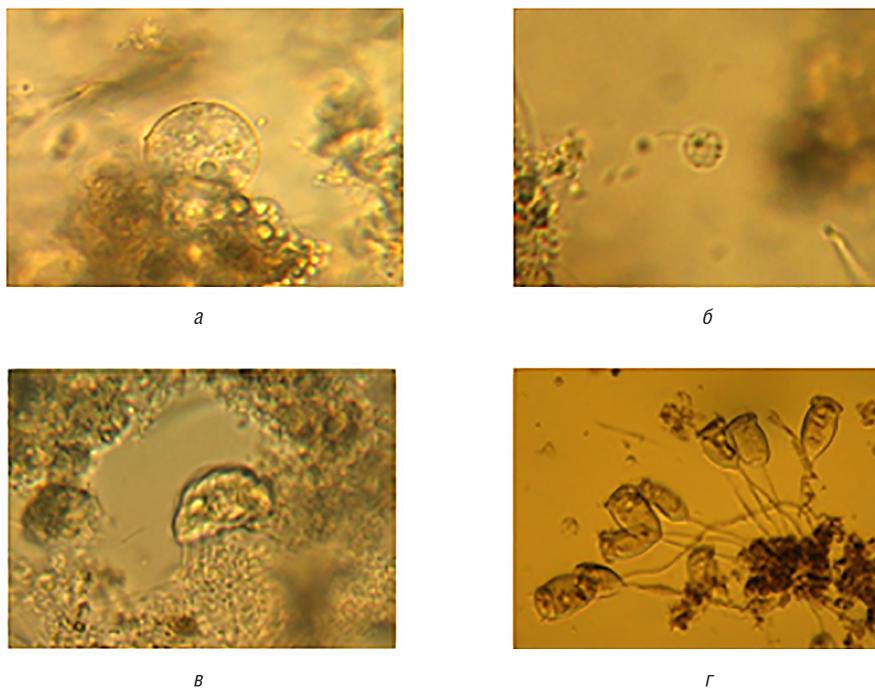


Рис. 2. Организмы биоценоза активного ила: а – раковинная амёба; б – жгутиконосцы *Petalomonas pusilla*; в – брюхоресничные инфузории *Aspidisca costata*; г – кругоресничные инфузории рода *Vorticella*

ничные инфузории *Aspidisca costata* (рис. 2, в), которые часто встречаются в иле различных условий очистки, кругоресничные инфузории (перитрихи) рода *Vorticella* (рис. 2, з), отличающиеся высокой пластичностью приспособления к условиям среды и встречающиеся при различных органических нагрузках.

Представленные на диаграмме результаты (рис. 3, а) свидетельствуют о том, что в исследуемом АИ преобладают организмы 4 индикаторных групп: мелкие и крупные жгутиконосцы, кругоресничные и брюхоресничные инфузории. Их численность составляет 36,6; 24,8; 23,5 и 9,9 % от общей численности соответственно. Количество организмов остальных традиционно учитываемых групп не превышает 3 %. Это дает основание считать уровень деструкционного потенциала изученного ила низким (неполная очистка сточных вод, снижение БПК до 90 % и менее).

Проведение через 7 мес. повторного гидробиологического анализа АИ БОС КУП «Копыльское ЖКХ» показало, что препарат положительно влияет на развитие биоценоза последнего. Как видно из диаграммы (рис. 3, б), в исследуемом АИ численно преобладают 7 индикаторных групп:

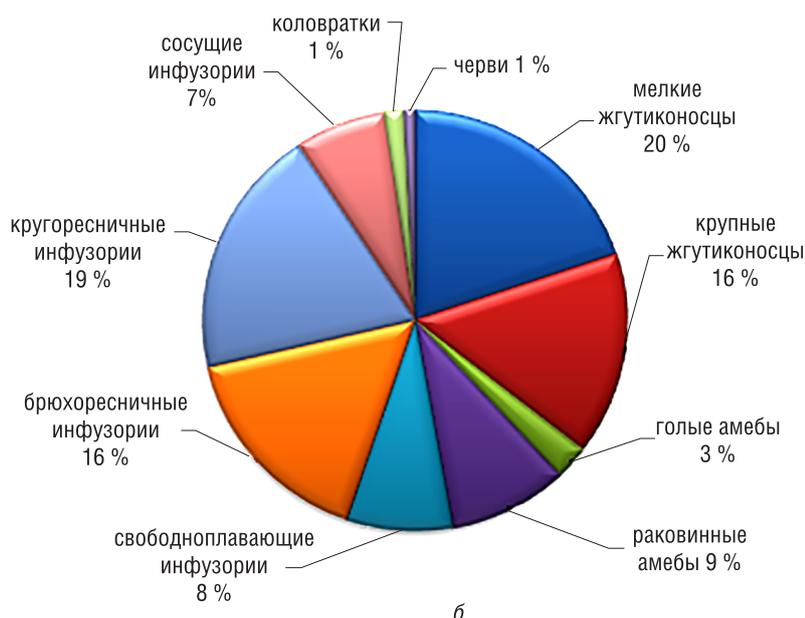


Рис. 3. Распределение организмов активного ила по основным индикаторным группам: а – до внесения препарата Антойл; б – через 7 мес. после внесения

мелкие и крупные жгутиконосцы, раковинные амёбы, свободноплавающие, кругоресничные, брехоресничные и сосущие инфузории. Следует отметить появление в АИ сосущих инфузорий родов *Vaginicola*, *Cothurnia* и *Opercularia coarctata*, которые являются индикаторами достаточно высокого качества очистки. Обнаружены беспанцирные колеровки *Rotaria rotatoria*, которые являются обитателями ила обычных аэротенков, обеспечивающих полное окисление загрязняющих веществ.

Закключение. В результате проведенных исследований установлено, что численность спорообразующих микроорганизмов, бактерий, усваивающих минеральные формы азота и актиномицетов, а также микроорганизмов – деструкторов жировых веществ в составе АИ достигла постоянного уровня через 2 недели после внесения в него препарата Антойл и составила $2,1 \cdot 10^{11}$, $7,6 \cdot 10^7$, $8,7 \cdot 10^6$ КОЕ/мл соответственно. Производственные испытания препарата на БОС КУП «Копыльское ЖКХ» показали, что внесение микроорганизмов – деструкторов жировых веществ, составляющих основу препарата, способствует улучшению качества обработанного АИ и повышению его окислительной способности. Это является основанием для использования препарата Антойл для интенсификации очистки городских сточных вод от жировых веществ в условиях биологических очистных сооружений, работающих с активным илом.

Список использованной литературы

1. Дернович, А. С. Аэробные биосистемы очистки стоков молокоперерабатывающих предприятий / А. С. Дернович // Наука и инновации. – 2013. – № 11. – С. 66–70.
2. Treatment Matrix for Reuse of Upgraded Wastewater / J. H. van der Graaf [et al.] // Water Sci. and Technol. – 2005. – Vol. 5, N 1. – P. 87–94.
3. Masse, L. Testing of Alkaline and Enzymatic Hydrolysis Pretreatments for Fat Particles in Slaughterhouse Wastewater / L. Masse, K. J. Kennedy, S. Chou // Bioresource Technology. – 2001. – Vol. 77. – P. 145–155.
4. Никифоров, Л. Л. Перспективы совершенствования систем очистки сточных вод / Л. Л. Никифоров // Мясная индустрия. – 2007. – № 11. – С. 59–62.
5. Electrocoagulation of Tannery Wastewater using Monopolar Electrodes: Process Optimization by Response Surface Methodology / G. Varank [et al.] // Int. J. Environ. Res. – 2014. – Vol. 8. – P. 165–180.
6. Chirikova, M. S. Application efficiency of microbial preparation designed to intensify disposal of lipid compounds in wastewaters / M. S. Chirikova, T. P. Shakun, A. S. Samsonova // Life chemistry research: biol. systems. – Waretown: Apple Acad. Press Inc., 2015. – P. 219–225.
7. Кутикова, Л. А. Фауна аэротенков (атлас) / Л. А. Кутикова. – Ленинград: Наука, 1984. – 262 с.

Поступила в редакцию 21.03.2016

УДК 575.22+577.21:582.912.46

Н. В. ВОДЧИЦ

ПРИМЕНЕНИЕ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ РАСТЕНИЙ РОДА *VACCINIUM*

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь,
e-mail: vodna76@mail.ru

Генотип четырех сортов голубики щитковой (*Vaccinium corymbosum*), двух сортов-гибридов *V. angustifolium* × *V. corymbosum* и черники обыкновенной анализировали с помощью пяти ISSR-праймеров (UBC 808, 818, 824, 845, 867), с помощью которых было выявлено 128 маркерных фрагмента. Из общего числа ISSR-фрагментов голубики 22,7 % были общими для всех сортов. При одинаковом наборе праймеров у черники с голубикой совпало 68,0 % мономорфных фрагментов. Полученные маркеры можно использовать для паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium*.

Ключевые слова: заякоренные праймеры, межтандемные сегменты, микросателлиты, маркеры.

N. V. VODCHITS

THE ASSESSMENT OF ISSR MARKERS APPLICATION TO GENETIC TYPING AND CERTIFICATION OF *VACCINIUM* PLANTS

Paleski State University, Pinsk, Belarus, e-mail: vodna76@mail.ru

Genotypes of four *Vaccinium corymbosum* cultivars and two cultivars of *V. angustifolium* × *V. corymbosum*, along with wild individuals of *V. myrtillus*, were analyzed using five inter-simple sequence repeat (ISSR) primers (UBC 808, 818, 824, 845, 867). The primers produced 128 bands on the whole; 22.7 % of the bands were common to all blueberry cultivars. In the case of *V. myrtillus*, 68.0 % of its bands were identical with monomorphic bands in cultivated blueberries. The obtained sets of consistent bands can be considered as cultivar passports and they can be used for *Vaccinium* cultivars certification. Cluster analysis of genetic similarity between cultivars, based on ISSR profiles, is provided.

Keywords: anchored primers, microsatellites, markers.

Введение. Активное развитие голубиководства в Республике Беларусь началось в начале XXI в., после того как вступили в стадию полного плодоношения первые промышленные насаждения данной культуры. Этому предшествовала исследовательская работа по определению наиболее пригодных и хозяйственно ценных сортов с определенным экологическим потенциалом [1]. С увеличением числа новых сортов все более важным становится процесс регистрации культурного сорта, его сертификации и защиты авторских прав селекционеров. Генетическая паспортизация представляет собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью морфологических или молекулярных маркеров [2]. В настоящее время разработано большое количество типов молекулярно-генетических маркеров [3]. Метод ISSR основан на анализе участков ДНК, расположенных между микросателлитными повторами, диспергированными по всему растительному геному, и обеспечивает воспроизводимый результат при детекции большого числа локусов [4].

Цель данного исследования – ДНК-паспортизация и сертификация ряда сортов голубики и черники обыкновенной на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов с целью идентификации сортов, проверки чистосортности маточных насаждений и посадочного материала.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического

факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ).

Объектом исследования явились полугодовые растения голубики щитковой – *Vaccinium corymbosum* L. (сорта Bluecrop, Northland, Reka, Denis blue, Northblue и Bluejay), произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ. Кроме того, для сравнения в исследование был включен дикорастущий вид брусничных – черника обыкновенная (*V. myrtillus* L.), произрастающая в лесах Пинского района.

Выделение ДНК проводили СТАВ-методом, с небольшими модификациями применительно к объекту исследования [5, 6]. ДНК изолировали из 0,03 г молодых тонких стеблей каждого сорта, без очистки РНКазой. Препарат ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Растворы нуклеиновых кислот хранили при -20°C .

Реакционная смесь для проведения ПЦР (объем 25 мкл) включала следующие компоненты: $10 \times$ ПЦР-буфер «А», 50 мМ MgCl_2 , 10 мМ dNTP-mix, 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*-ДНК полимеразы (все производства PrimeTech, Беларусь, за исключением dNTP-mix производства Carl Roth, Германия). Полимеразные цепные реакции проводили в термоциклере Biometra. Для праймеров UBC 818, UBC 824 и UBC 845 устанавливали следующую программу: $94^{\circ}\text{C} - 30 \text{ с}$; $94^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин}$, $50^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин}$, $72^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин}$ (40 циклов); $72^{\circ}\text{C} - 5 \text{ мин}$. Для праймеров UBC 808 и UBC 867 устанавливали следующие режимы: $94^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин}$; $94^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин}$, $46,5^{\circ}\text{C} - 1 \text{ мин}$, $72^{\circ}\text{C} - 2 \text{ мин}$ (35 циклов); $72^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин}$.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2 %-ном агарозном геле [7]. Для определения длины фрагментов ДНК использовали размерные маркеры 100 bp Plus DNA Ladder (производства Thermo Scientific, Литва), 766 bp и 1 Kb DNA Ladder (производства PrimeTech, Беларусь).

Для анализа геномов растений применяли пять 3'-заякоренных ISSR-праймеров (табл. 1), последовательности которых были взяты из работ [8–10].

Т а б л и ц а 1. Характеристики микросателлитных праймеров, использованных для генотипирования сортов голубики

Праймер	Последовательность 5'→3'	Температура отжига T_m , $^{\circ}\text{C}$	GC, %
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	46,5	53
UBC 818	CACACACACACACAG	50	53
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCG	50	53
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTRG	50	50
UBC 867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	46,5	100

П р и м е ч а н и е. R равен А или G.

Для визуализации результатов электрофореза использовали прибор гель-документирования Quantum ST4 [7]. Уровень полиморфизма определяли как отношение числа полиморфных локусов к общему числу выявленных локусов у сортов голубики, детектируемых с помощью каждого праймера, и выражали в процентах.

Для количественной оценки полиморфизма полученные данные представляли в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в электрофоретических спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривали как состояние 1 или 0 соответственно. Статистическую обработку результатов и построение дендрограмм осуществляли с помощью кластерного анализа методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), в программе STATISTICA 6.0. В данном методе расстояние между двумя различными кластерами вычисляется как среднее расстояние между всеми парами объектов в них [11].

Результаты и их обсуждение. Использованные ISSR-праймеры содержали последовательности ди- и тринуклеотидных микросателлитных мотивов с добавлением якорного нуклеотида на 3'-конце (табл. 1). Они выявили для каждого исследуемого образца воспроизводимые специфичные электрофоретические спектры ISSR-фрагментов.

Во избежание ошибочных заключений о полиморфизме проведено 6-кратное повторение процедуры амплификации ДНК, выделенной из одного и того же источника. В исследованных нами профилях учитывались только стабильные при амплификации фрагменты. Данные о спектрах ампликонов, полученных с помощью ISSR-праймеров, приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Характеристика ISSR-спектров ампликонов растений рода *Vaccinium*

Праймер	Число маркеров		К-во полиморфных маркеров	Уровень полиморфизма, %	Число уникальных маркеров		Границы длин локусов в спектре, п. н.
	Голубика	Черника	Голубика	Голубика	Голубика	Черника	
UBC 808	17	10	13	76.5	4	4	260–1065
UBC 818	24	16	18	75.0	9	7	240–2000
UBC 824	24	14	17	70.8	6	1	440–1890
UBC 845	24	10	19	79.2	5	3	230–1600
UBC 867	21	8	18	85.7	8	3	350–1875

При электрофорезе основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 230–2000 п. н. В целом учитывалось 128 амплифицированных фрагмента – 110 для голубики (в среднем 22,0 маркера на праймер) и 58 – для черники (в среднем 11,6 маркера на праймер). Число маркеров для голубики варьировалось от 17 с праймером UBC 808 до 24 с праймерами UBC 818, 824 и 845, для черники – от 8 с праймером UBC 867 до 16 с праймером UBC 818. Из общего числа ISSR-фрагментов голубики 85 (77,3 %) были полиморфны у изученных генотипов, а 25 (22,7 %) были общими для всех сортов; 17 (68,0 %) локусов, детектируемых у черники, совпадали с мономорфными фрагментами голубики. Самый высокий процент полиморфных ISSR-фрагментов – 85,7 % (у 18 из 21) – получен при амплификации ДНК с праймером UBC 867 (рис. 1). Самый низкий процент выявлен в случае праймера UBC 824 – 70,8 % (17 из 24) фрагментов были полиморфны (рис. 2). Средний уровень полиморфизма между исследуемыми сортами составлял 77,4 %.

Определенная часть (32 (25,0 %)) выявленных маркеров у голубики относится к редким, т. е. они встречались только один раз среди анализируемых генотипов. Отношение числа генотип-специфических маркеров к общему числу ампликонов у 14,1 % *V. myrtillus* составило 18. С помощью

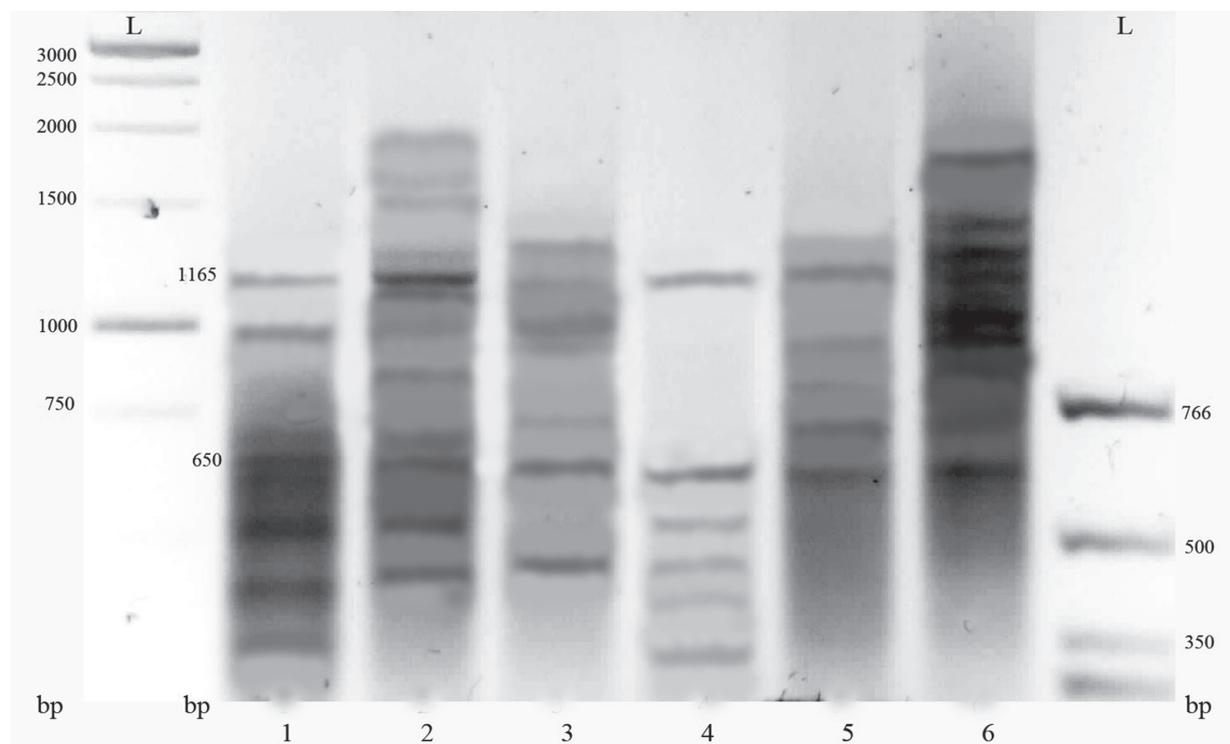


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 867. Сорта: 1 – Bluecrop, 2 – Northland, 3 – Reka, 4 – Denis blue, 5 – Northblue, 6 – Bluejay. L – стандарт длин фрагментов (bp)

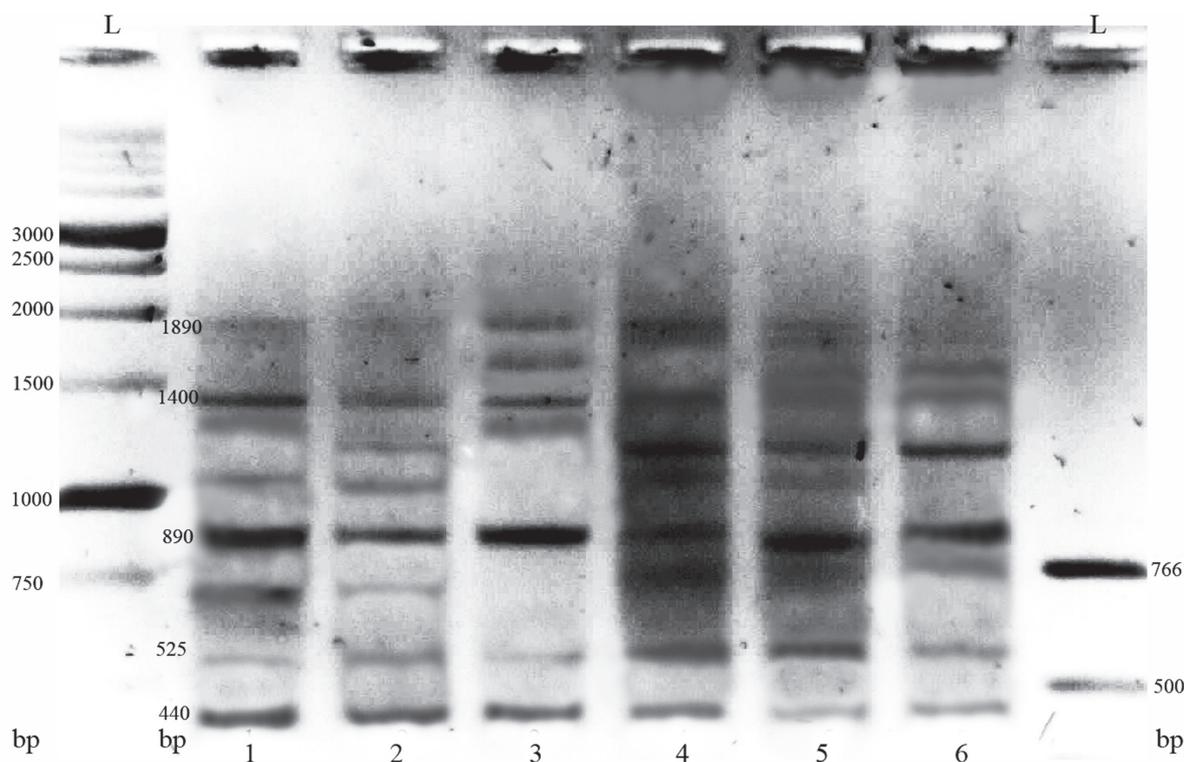


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 824. Сорта: 1 – Bluecrop, 2 – Northland, 3 – Reka, 4 – Denis blue, 5 – Northblue, 6 – Bluejay. L – стандарт длин фрагментов (bp)

исследуемых праймеров выявлены уникальные фрагменты, которые в дальнейшем можно использовать для создания SCAR-маркеров.

У всех праймеров обнаружен 100 %-ный полиморфизм между проанализированными сортами, что и позволило их различить (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Аллельный полиморфизм ISSR-маркеров растений рода *Vaccinium*

Сорт	Праймер/локусы				
	UBC 818	UBC 824	UBC 808	UBC 845	UBC 867
Bluecrop	300, 450, 500, 550, 580, 615, 660, 790, 880, 930, 1000, 1060, 1180, 1290	440, 525, 630, 670, 715, 810 , 830, 890, 990, 1050, 1400, 1430 , 1500, 1655, 1790, 1890	335, 390, 405, 445, 475 , 510, 685, 760, 840	325, 410, 505, 530, 705, 730, 895, 1005 , 1250	350, 430, 455, 540 , 610, 650, 710 , 800, 1165
Northland	300, 330, 400 , 450, 500, 550, 580, 615, 660, 750, 790, 880, 930, 1060, 1260, 1590 , 2000	440, 525, 670, 715, 890, 1050, 1110, 1150, 1210, 1400, 1655, 1890	260 , 335, 405, 445, 510, 560, 685, 760, 820	230, 325, 360, 410, 505, 530, 600, 705, 730, 895, 1080, 1250, 1600	470, 650, 745, 800, 855, 965, 1070, 1165, 1265, 1510, 1630, 1820
Reka	300, 330, 450, 500, 550, 615, 660, 750, 790, 880, 930, 1000, 1060, 1260, 1330	440, 525, 670, 715, 830, 890, 1050, 1150, 1280, 1400, 1500, 1750, 1790, 1890	290, 335, 390, 405, 445, 510, 560, 605, 685, 760, 820, 870, 940	310, 325, 410, 460, 505, 640, 705, 815, 895, 935, 1080, 1200, 1600	470, 610, 650, 800, 855, 965, 1070, 1165, 1265, 1420
Denis blue	300, 330, 450, 500, 550, 580, 615, 660, 790, 880, 1060, 1260, 1440, 1690 , 2000	440, 525, 670, 715, 890, 1050, 1110, 1210, 1400, 1655, 1750, 1890	290, 335, 405, 445, 510, 560, 605, 685, 760, 820, 1065	230, 310, 325, 360, 410, 460, 505, 530, 570 , 640, 705, 895, 935, 1155 , 1200	350, 430, 470, 555 , 650, 745, 1070, 1165

Сорт	Праймер/локусы				
	UBC 818	UBC 824	UBC 808	UBC 845	UBC 867
Northblue	300, 450, 500, 550, 615, 660, 790, 1060	440, 525, 585, 670, 715, 890, 945 , 1090 , 1210, 1280, 1400, 1890	290, 390, 445, 510 , 560, 605, 685, 760, 820, 870, 940	325, 410, 460, 505, 600, 640, 705, 730, 895, 1080, 1200, 1250	650 , 745, 800, 965, 1070, 1165
Bluejay	240 , 300, 330, 375, 450, 500, 580, 615, 790, 930, 1060	440, 525, 585, 670, 715, 830, 890, 1110, 1210, 1400, 1790, 1890	290, 445, 510, 685, 760, 870, 940	230, 250 , 325, 360, 410, 505, 640, 705, 815, 895, 1040 , 1250	650, 745, 800, 1070, 1165, 1265, 1420, 1720
Черника	300, 330, 380 , 450, 465 , 530 , 660, 680 , 790, 880, 960 , 1060, 1210 , 1330 , 1440, 1490	440, 525, 670, 740 , 830, 890, 1050, 1110, 1210, 1400, 1655, 1750, 1890	260, 335, 390, 475, 560, 620 , 720 , 760, 795 , 900	310, 380 , 410, 505, 600, 705, 935, 1055 , 1115 , 1250	350, 555, 650, 710, 835 , 925 , 1165, 1875

Примечание. Жирным шрифтом обозначены уникальные фрагменты; курсивом – мономорфные фрагменты; локусы, совпавшие с таковыми в других работах, опубликованных ранее, подчеркнуты.

Наши результаты частично согласуются с полученными ранее в другой лаборатории данными по ISSR-анализу сортов голубики высокой с праймерами UBC 818 и UBC 824 [8].

На основании комплекса данных о частоте встречаемости аллелей и о размере амплифицированных последовательностей для каждой аллели проведена оценка степени генетического сходства изученных генотипов.

Согласно результатам, представленным на дендрограмме, как и следовало ожидать, наиболее удаленной от сортов голубики оказалась черника обыкновенная из естественных популяций (рис. 3), для которой дистанции, выраженные величиной, обратной коэффициенту Пирсона, находились в диапазоне от 0,88 (по отношению к сорту Denis blue) до 1 (по отношению к сорту Reka).

Генотипы сортов голубики, за исключением сорта Bluecrop, сформировали два кластера, т. е. группы с меньшей внутригрупповой изменчивостью признаков по сравнению с изменчивостью в совокупности. В первый вошли сорта Nortland и Denis blue, во второй – сорта Reka, Northblue и Bluejay. Сорт Bluecrop отличался от геномов исследуемых сортов голубики,

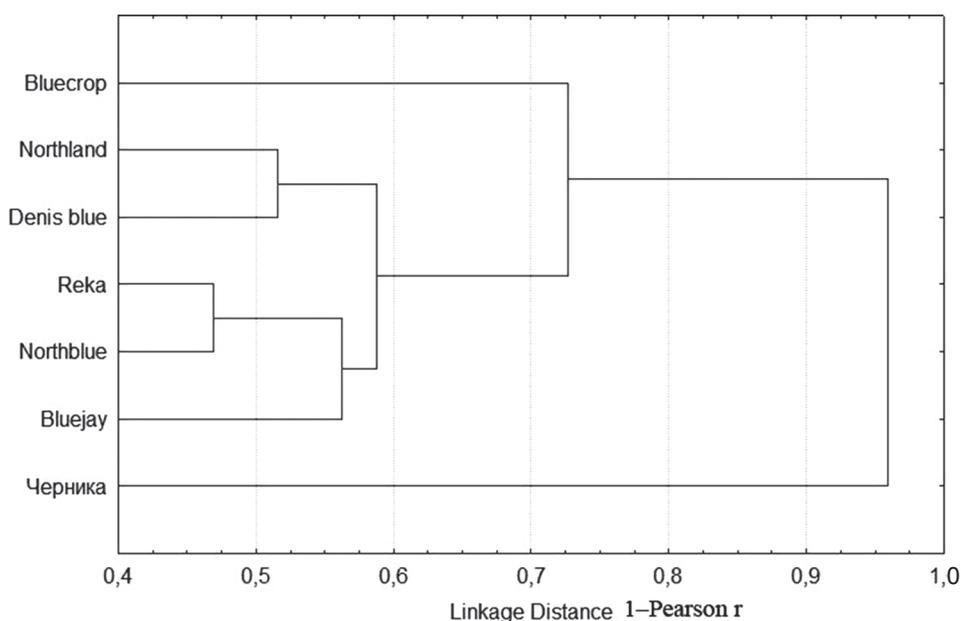


Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства, основанная на данных ISSR-анализа сортов голубики и черники обыкновенной

и коэффициент генетической дистанции его от других сортов составил от 0,70 до 0,75. Сорт голубики Bluecrop и черника обыкновенная, обладающие наибольшим количеством уникальных ISSR-локусов, образовали отдельные ветви дендрограммы. Генетическое расстояние между изученными представителями голубики варьировалось от 0,47 (между сортами Reka и Northblue) до 0,75 (между сортами Bluecrop и Denis blue; Bluecrop и Bluejay). Следует отметить, что межвидовые гибриды *V. corymbosum* и *V. angustifolium* L. – Northblue, Northland распределились в разные группы, а генетическое расстояние между ними составило 0,55.

Можно предположить, что вошедшие в отдельные кластеры сорта – {Northland, Denis blue}, а также {Reka, Northblue, Bluejay} – имеют генотипически сходные родительские формы.

Заключение. Впервые в Беларуси проведен молекулярно-генетический сравнительный анализ сортов голубики с применением только ISSR-подхода. Исследование растений четырех сортов *V. corymbosum*, двух сортов от гибридизации – *V. angustifolium* × *V. corymbosum* (Northland и Northblue) и *V. myrtillus* – показало наличие мономорфных для всех ISSR-фрагментов. Следовательно, можно сделать вывод, что ISSR-маркеры применимы при исследовании как внутривидового, так и межвидового генетического полиморфизма растений. При одинаковом наборе праймеров у черники с голубикой совпало 68,0 % мономорфных фрагментов, а число уникальных маркеров для черники составило 14,1 % относительно всех выделенных фрагментов. Это доказывает, что голубика и черника являются отдаленными видами одного рода и семейства.

На основании полученных данных ISSR-спектров и проведенного кластерного анализа получены данные о генетическом родстве исследованных генотипов растений рода *Vaccinium*.

В целях повышения эффективности генетических исследований полученные ранее результаты необходимо расширить за счет включения новых маркеров, обладающих иными аллелями, которые могут быть полезны для разработки селекционных программ.

Список использованной литературы

1. Титок, В. В. Голубика высокорослая – инновационная культура премиум-класса / В. В. Титок, А. А. Веевник, Н. Б. Павловский // Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы: материалы Респ. науч.-практ. конф., Минск, 17 авг. 2012 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси, редкол.: В. В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2012. – С. 5–8.
2. Бобошина, И. В. Идентификация перспективных для Урала сортов пшеницы мягкой с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК / И. В. Бобошина, С. В. Боронникова // Фунд. исслед. – 2013. – № 6 (1). – С. 92–97.
3. Карлов, Г. И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Г. И. Карлов; Рос. гос. аграр. ун-т. – М., 2009. – 50 с.
4. Оценка генетической разнородности линий томата на основе технологии ISSR-PCR / В. Н. Кавцевич [и др.] // Вес. БДПУ. Сер. 3. – 2013. – № 3. – С. 18–23.
5. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц [и др.] // Весн. Палеск. дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўч. навук. – 2014. – № 2. – С. 25–30.
6. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E. L. Dempster [et al.] // Biotechnology. – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 66–68.
7. Водчиц, Н. В. Выявление генетической разнородности сортов голубики методом ISSR-маркирования / Н. В. Водчиц, Е. О. Юрченко, А. А. Вологович // Инновационные технологии в науке и образовании: материалы IV Междунар. науч.-практ. конф., Чебоксары, 18 дек. 2015 г. / редкол.: О. Н. Широков (отв. ред.) [и др.]. – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2015. – № 4 (4). – С. 15–19.
8. Сертификация сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD- и ISSR-маркеров / А. Б. Власова [и др.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 203–210.
9. Debnath, S. C. Development of ISSR markers for genetic diversity studies in *Vaccinium angustifolium* / S. C. Debnath // Nordic J. Bot. – 2009. – Vol. 27, N 2. – P. 141–148.
10. Application of inter-simple sequence repeats relative to simple sequence repeats as a molecular marker system for indexing blueberry cultivars / M. Garriga [et al.] // Can. J. Plant Sci. – 2013. – Vol. 93, N 5. – P. 913–921.
11. Леончик, Е. Ю. Кластерный анализ: терминология, методы, задачи / Е. Ю. Леончик; ОНУ им. И. И. Мечникова, ИМЭМ. – 2-е изд., испр. и доп. – Одесса, 2011. – 67 с.

Поступила в редакцию 23.05.2016

УДК 631.461

А. Ю. ТАРАСЕВИЧ

**ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ
ДИЗЕЛЬНЫМ ТОПЛИВОМ, ПРИ ВНЕСЕНИИ БИОМЕЛИОРАНТОВ**

*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Беларусь,
e-mail: arlif@mail.ru*

Статья посвящена изучению изменения активности почвенных ферментов в почве, загрязненной дизельным топливом. Дегидрогеназная и инвертазная активность измерялась 4 раза на протяжении 3 мес. Анализ полученных данных свидетельствует об изменении активности почвенных ферментов в зависимости от состава грунта и внешних условий проведения эксперимента.

Ключевые слова: загрязнение почвы, дизельное топливо, дождевые черви, биоремедиация.

A. Ju. TARASEVICH

ENZYMATIC ACTIVITY IN THE DIESEL FUEL CONTAMINATED SOIL WITH BIOAMELIOTANTS

*Scientific and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus,
e-mail: arlif@mail.ru*

The article is dedicated to changes of soil enzymes' activity in the soils, contaminated with diesel fuel. The dehydrogenase' and invertase' activities were measured four times during 3 month experiment. The data obtained indicates changes of the soil enzymatic activity depending on the composition of the soil and environmental conditions of the experiment.

Keywords: soil pollution, diesel fuel, earthworms, bioremediation.

Введение. Определение ферментативной активности включает комплекс биологических показателей, которые могут быть использованы в качестве биоиндикаторов экологического состояния почв [1–3]. Диагностику рекультивации почвы, загрязненной углеводородами, можно осуществлять посредством измерения в ней активности таких ферментов, как дегидрогеназа и инвертаза.

Дегидрогеназа является внутриклеточным ферментом, который характерен для всех почвенных микроорганизмов, получающих энергию за счет окисления разнообразных субстратов почвы [4], и активность которого отражает функциональное состояние почвенной микрофлоры. При определении активности дегидрогеназы в почве анализируется соответствующая активность микрофлоры, ферменты которой воздействуют на субстрат. Дегидрогеназа причислена к основным деструкторам углеводородов, и уровень ее активности является критерием микробиологического самоочищения от этих веществ [5].

Инвертаза гидролизует сахарозу на глюкозу и фруктозу. Она широко распространена в природе и встречается почти во всех типах почв. Активность инвертазы является характерным показателем типов почв и их биологической активности [4]. По ней можно оценить степень окультуренности почвы, процент содержания гумуса, хотя повышение плодородия дерново-подзолистых почв сопровождается повышением уровня рН, что снижает активность инвертазы [6].

Цель настоящей работы – проследить изменения активности дегидрогеназы и инвертазы в почве, загрязненной дизельным топливом, в присутствии микробного препарата «Экобел», навоза крупного рогатого скота и культивируемой популяции навозного червя *Eisenia foetida* (Savigny, 1826).

Материалы и методы исследования. Эксперимент по рекультивации почвы после загрязнения ее дизельным топливом (доза внесения 2,5 г/кг) проведен на базе Промышленно-торгового унитарного предприятия «ПромХимЭлектро» (г. Червень) в период с 05.01.2012 по 22.05.2012. Указанная концентрация загрязнителя выбрана по результатам лабораторных тестов на острую летальность [7]. Для Беларуси это сильная степень загрязнения, которое естественное микробное сообщество быстро переработать не в состоянии. В то же время концентрация загрязнителя недостаточно высокая для экскавации и сжигания загрязненного грунта.

Определение выживаемости культуры навозных червей в субстрате проведено по методике, разработанной на основе стандартных методик [8, 9]. В отапливаемом помещении фермы на бетонном полу 05.01.2012 было заложено 28 гряд площадью по 0,25 м², высотой 10 см, огороженных досками. Среднесуточные температуры воздуха в помещении составляли от 8 ± 2 °С в начале эксперимента до 18 ± 2 °С – в конце.

В эксперименте использованы микробный препарат «Экобел» (предоставлен лабораторией деградации ксенобиотиков и биоремедиации природных и производственных сред «Института микробиологии НАН Беларуси») и маточная популяция навозных червей *E. foetida* (предоставлена ПТУП «ПромХимЭлектро»).

Опыт запущен 19.02.2012. Для сравнения эффективности рекультивации загрязненной нефтепродуктами почвы микробиологическим препаратом, культурой дождевых червей, микробным препаратом и червями получено 7 вариантов заполнения гряд:

- 1) естественная почва с дизельным топливом, микробным препаратом «Экобел»;
- 2) естественная почва с дизельным топливом;
- 3) естественная почва с навозом крупного рогатого скота (КРС), микробным препаратом;
- 4) естественная почва с навозом КРС, дизельным топливом;
- 5) естественная почва с навозом КРС, червями;
- 6) естественная почва с навозом КРС, дизельным топливом, червями;
- 7) естественная почва с навозом КРС, дизельным топливом, микробным препаратом, червями.

Гряды № 2 и 3, 4, 5 являются контролем для № 1 и 6, 7 соответственно.

Отбор почвенных образцов с площади гряд для проведения анализов производили 19.02.2012, 19.03.2012, 19.04.2012 и 22.05.2012 из слоя 0–10 см методом «конверта». Из отдельных проб составляли усредненные образцы. Почву высушивали, измельчали и просеивали через сито с диаметром ячеек 1–2 мм.

Для количественного определения дегидрогеназной активности в качестве субстрата использовали бесцветные соли 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого, который, акцептируя мобилизованный дегидрогеназный водород, превращается в 2,3,5-трифенилформазан, имеющий красную окраску. Используются реактивы: 0,1 М раствор глюкозы, 1 %-ный раствор ТТХ, этанол (ректификат), фосфатный буфер, рН = 7,2 (раствор NaH₂PO₄·12H₂O + KH₂PO₄).

Фотоколориметрическое определение активности инвертазы основано на учете восстанавливающих сахаров, образующихся при расщеплении сахарозы. Для определения инвертазной активности почвы использованы реактивы: 20 %-ная сахароза, толуол, 2 М ацетатный буфер (рН = 5,5), CH₃COONa; CuSO₄·5H₂O, Na₂CO₃, NaHCO₃, Na₂SO₄, толуол, 0,2 М NaHPO₄·12H₂O, H₂SO₄_{конц}, (NH₄)₂MoO₄.

Измерение активности почвы проводили на базе сектора вермитехнологий ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» на фотометре КФК-3 согласно методикам [4, 10, 11].

Анализ образцов на основные химические почвенные показатели проведен лабораторией агроэкологии «Института природопользования НАН Беларуси» согласно методикам (ГОСТ 26714-85, ГОСТ 27979-88, ГОСТ 26715-85, ГОСТ 26717-85, ГОСТ 26718-85, ГОСТ 26716-85).

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 приведены результаты трехмесячного исследования выживаемости навозных червей в субстрате, загрязненном дизельным топливом.

В конце опыта в грядах № 5 выявлены взрослые особи (в среднем по 36 особей) и коконы навозных червей, что свидетельствует об адаптации животных к субстрату и о достижении субстратом температурного оптимума для размножения червей. В грядах № 6 обнаружены по 2 особи животных (в среднем по 4 повторностям). Коконов не найдено. В грядах № 7 в конце эксперимента выявлено в среднем по 4 особи, которые имели здоровый внешний вид и отличались по-

движностью. Кроме того, наличие в субстрате коконов свидетельствовало о благоприятных для размножения червей условиях.

Т а б л и ц а 1. **Выживаемость навозных червей в субстрате, загрязненном дизельным топливом, %**

Показатель выживаемости	Вариант опыта		
	5 (n = 50)	6 (n = 50)	7 (n = 50)
Через 2 недели	90,0 ± 3,7	48,0 ± 10,7	56,0 ± 14,0
Через 4 недели	80,0 ± 9,4	40,0 ± 8,2	42,0 ± 6,7
Через 8 недель	78,0 ± 9,9	16,0 ± 10,6	26,0 ± 4,3
Через 12 недель	72,0 ± 8,5	4,0 ± 1,6	8,0 ± 2,8

П р и м е ч а н и е. n – количество животных в гряде при запуске.

Часть популяции червей в начале опыта во всех вариантах наполнения гряд, в том числе в контроле, естественно, погибает, а количество погибших червей определяется факторами окружающей среды. Почва и навоз, использованные в опыте, не были загрязнены пестицидами и тяжелыми металлами, содержали достаточное количество биогенных элементов, кислотность субстрата – нейтральная. Влажность субстратов поддерживалась на оптимальном для популяции навозных червей и микробного препарата уровне (70 %) на протяжении всего опыта. Таким образом, не исключено, что гибель части популяции червей в экспериментальных грядах и в контроле в начале опыта определялась разницей температур исходного субстрата, в котором обитала популяция, и гряд ($\Delta = 6-10$ °C).

Дегидрогеназная активность субстратов измерена согласно методике [10]. Результаты представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. **Активность дегидрогеназы в образцах, мг ТФФ/1 г почвы за 24 часа**

Месяц	Вариант опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Февраль	0,177 ± 0,009	0,177 ± 0,009	0,162 ± 0,008	0,153 ± 0,008	0,162 ± 0,008	0,153 ± 0,008	0,153 ± 0,008
Март	0,143 ± 0,007	0,091 ± 0,005	0,174 ± 0,009	0,155 ± 0,008	0,172 ± 0,009	0,204 ± 0,010	0,183 ± 0,009
Апрель	0,128 ± 0,006	0,144 ± 0,006	0,153 ± 0,008	0,116 ± 0,006	0,096 ± 0,005	0,090 ± 0,004	0,095 ± 0,005
Май	0,136 ± 0,007	0,127 ± 0,006	0,116 ± 0,006	0,123 ± 0,006	0,147 ± 0,007	0,094 ± 0,005	0,190 ± 0,009

По результатам анализов, самые высокие концентрации дегидрогеназы в субстрате наблюдались в начале эксперимента в вариантах № 1, 2 – в грядах, содержащих почву, загрязненную дизельным топливом (0,25 %). Они в 1,3 раза превышали концентрации данного фермента в исходной (незагрязненной) почве. Дегидрогеназная активность субстрата, содержавшего загрязненную почву и навоз КРС (20 % от массы субстрата), была выше, чем в чистой почве, но ниже, чем в почве, содержавшей дизель.

Через месяц после запуска в гряды микробного препарата и червей самая высокая дегидрогеназная активность зарегистрирована в загрязненном субстрате с червями (вариант 6). Не исключено, что такой результат дала массовая гибель животных в субстрате. Дегидрогеназная активность загрязненной дизельным топливом почвы (вариант 1) к третьей декаде марта несколько снизилась, что может свидетельствовать о частичной утилизации загрязнителя микробным препаратом. Самую низкую дегидрогеназную активность в марте регистрировали в субстрате, содержавшем только загрязненную дизелем (2,5 г/кг) почву (вариант 2). Это может свидетельствовать об отрицательном воздействии нефтепродуктов на почвенную микрофлору.

К третьей декаде апреля дегидрогеназная активность в субстратах, содержавших популяции навозных червей, снизилась. В вариантах 5, 6, 7 зарегистрированы одинаково низкие концентрации фермента. Это может быть связано со снижением активности животных в результате прекращения отопления помещений.

К концу эксперимента дегидрогеназная активность в 7-м варианте (загрязненная почва, навоз КРС, микробный препарат, черви) возросла по сравнению с таковой в апреле в 2 раза. Тем не менее,

говорить о восстановлении субстрата после загрязнения сложно, поскольку концентрации дегидрогеназы в 1,5 раза выше, чем в исходной чистой почве (0,124 мг ТФФ/1 г почвы за 24 ч).

Инвертазную активность определяли по методу Гофмана и Паллауфа [4]. Результаты представлены в табл. 3. Согласно полученным данным, инвертазная активность образца незагрязненной почвы без навоза, отобранного в начале опыта, равнялась таковой незагрязненной почвы с навозом (1,43 мг/10 г почвы за 3 ч). Активность субстратов, загрязненных дизельным топливом (№ 1, 2, 4, 6, 7), была незначительно выше, чем субстратов незагрязненных (варианты 3, 5, почва без добавок), перед обработкой их микробным препаратом и запуском в них навозных червей, что свидетельствует об активизации фермента в почве под действием загрязнителя.

Т а б л и ц а 3. Концентрация инвертазы в почве, мг/10 г почвы за 3 ч

Месяц	Вариант опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Февраль	1,53 ± 0,08	1,53 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,52 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,52 ± 0,08	1,52 ± 0,08
Март	1,45 ± 0,07	1,53 ± 0,08	1,48 ± 0,07	1,59 ± 0,08	1,43 ± 0,07	1,48 ± 0,07	1,50 ± 0,07
Апрель	1,22 ± 0,06	1,13 ± 0,06	1,17 ± 0,06	1,13 ± 0,06	1,24 ± 0,06	1,07 ± 0,05	1,21 ± 0,06
Май	1,23 ± 0,06	1,49 ± 0,07	1,50 ± 0,07	1,35 ± 0,07	1,53 ± 0,08	1,29 ± 0,06	1,30 ± 0,06

Через месяц после внесения в субстраты бактериального препарата и червей самую высокую инвертазную активность регистрировали в субстрате, содержащем почву, навоз КРС и дизельное топливо (вариант 4); несколько меньшую – в почве, загрязненной дизельным топливом (вариант 2); самую низкую – в незагрязненном субстрате, содержащем навозных червей (вариант 5).

Инвертазная активность отобранных в апреле почвенных образцов несколько ниже, чем у зарегистрированных в другие месяцы во всех вариантах опыта. Поскольку подобная картина наблюдалась и с дегидрогеназной активностью, можно предположить, что на субстраты повлияло отсутствие отопления помещений в апреле, и, как следствие, низкие среднесуточные температуры (6 ± 2 °C). Самая высокая инвертазная активность зарегистрирована в субстрате с червями, без загрязнителя (вариант 5).

В конце опыта самая высокая инвертазная активность субстрата наблюдалась в незагрязненном субстрате с червями (вариант 5). Она была выше, чем в загрязненном субстрате с червями и бактериями (вариант 7). В варианте 7 это может свидетельствовать либо о более полной переработке органического вещества, либо о снижении активности фермента в результате гибели червей.

Из всех вариантов в конце опыта инвертазная активность субстрата была равна активности незагрязненной почвы (1,25 мг/10 грамм почвы за 3 ч) только в грядах № 1, что может свидетельствовать об очистке субстрата микробным препаратом от 0,25 % загрязнения дизельным топливом за 3 мес. Концентрации инвертазы в субстратах № 6 и 7 были ниже, чем в варианте 5 (незагрязненная почва + навоз), но приблизительно равны концентрациям в незагрязненной почве без навоза и червей (контроль) и в загрязненной почве с микробным препаратом (вариант 1). Это может свидетельствовать как о восстановлении почвы после загрязнения (в варианте 7), так и о снижении концентрации фермента в результате гибели червей (вариант 6).

Данные анализа почвенных образцов приведены в табл. 4.

Нитрифицирующие микроорганизмы очень чувствительны к загрязнению почв нефтью и нефтепродуктами. Самое высокое содержание нитратного азота в конце опыта зафиксировано в образце субстрата № 5, самое низкое – в образце субстрата № 2 (в почве, загрязненной дизельным топливом). Высокое содержание нитратного азота в варианте 1 в конце опыта может свидетельствовать о восстановлении субстрата после загрязнения дизельным топливом.

Небольшие массы как нитратного, так и аммиачного азота в субстратах № 6 и 7, по-видимому, явились результатом взаимодействия почвенной микрофлоры, микробной фауны желудочно-кишечного тракта навозных червей и КРС, дизельного топлива, а в варианте 7 – микроорганизмов препарата «Экобел».

Т а б л и ц а 4. Характеристики почвенных проб

Показатель	Вариант опыта						
	1	2	3	4	5	6	7
Массовая доля золы, %	87,2	90,9	91,7	90,4	88,3	87,8	90,5
pH	7,10	7,20	7,10	7,30	7,30	7,40	7,50
Массовая доля общего фосфора, %	0,45	0,25	0,34	0,46	0,59	0,38	0,41
Массовая доля общего калия, %	0,58	0,37	0,44	0,66	0,86	0,59	0,58
Массовая доля общего азота, %	0,75	0,39	0,43	0,58	0,63	0,57	0,55
Масса аммиачного азота, мг/100 г сухого вещества (для органических удобрений)	6,50	4,00	3,50	4,50	6,20	5,30	5,20
Масса нитратного азота, мг/100 г сухого вещества	14,40	2,40	16,60	8,70	23,70	8,30	6,00

Согласно табл. 4, больше всего аммиачного азота зарегистрировано в загрязненном субстрате с микробным препаратом (вариант 1). Согласно полученным данным, содержание аммиачного азота в загрязненной почве без микробного препарата (вариант 2) было ниже, чем в почве с микробным препаратом.

Анализ полученных в эксперименте данных выявил обратную корреляцию между инвертазной активностью и массовой долей общего азота в образцах субстратов ($r = -0,61$). Хотя максимальное количество нитратного азота зафиксировано в образце с самой высокой инвертазной активностью (вариант 5), корреляционная зависимость между данными показателями довольно слабая ($r = 0,35$). Самое высокое содержание общего и аммиачного азота зафиксировано в субстрате № 1 (загрязненная дизелем почва с микробным препаратом).

Корреляционной зависимости между содержанием в субстратах калия, фосфора и дегидрогеназы не обнаружено. Также не выявлено связи между содержанием данного фермента и кислотностью субстратов. Тем не менее, максимальное содержание и калия, и фосфора зарегистрировано в конце опыта в незагрязненном субстрате с навозными червями. В этом же 5-м варианте зарегистрированы самые высокие концентрации инвертазы. Загрязненная дизельным топливом почва (вариант 2) характеризовалась самыми низкими значениями массовой доли фосфора и калия.

Заключение. После загрязнения почвы дизельным топливом ее дегидрогеназная активность повысилась в 1,28 раза, инвертазная – в 1,07 раза. По результатам измерений можно заключить, что ферментативная активность в почве, загрязненной дизельным топливом, без добавок, за месяц вернулась к исходному уровню под воздействием микробиологического препарата «Экобел». Можно предположить, что в варианте 6 под воздействием культуры дождевых червей загрязнение почвы снизилось: данный субстрат характеризовался невысокой как дегидрогеназной, так и инвертазной активностью.

Одновременное внесение в загрязненный субстрат микробного препарата и подкормки для дождевых червей (навоз КРС) обеспечивает организмы-нефтедеструкторы дополнительными легкоусвояемыми источниками энергии. Микробы создают пищевую конкуренцию культивируемым популяциям дождевых червей, что снижает эффективность внесения последних в загрязненный субстрат и сокращает их численность. В грядках с микробным препаратом и навозом дегидрогеназная активность выше, чем в незагрязненной почве и в загрязненной, но без навоза.

По результатам проведенного опыта и последующих анализов сложно говорить о полной очистке или восстановлении почвы за 3 мес., поскольку внесение в субстрат дополнительного органического вещества полностью меняет состав субстрата и его микробные характеристики.

Список использованной литературы

1. Павлова, Н. Н. Пространственно-временные изменения биологической активности городских почв: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16; 03.00.07 / Н. Н. Павлова. – М., 2008. – 21 с.
2. Габбасова, И. М. Оценка состояния почв с давними сроками загрязнения сырой нефтью после биологической рекультивации / И. М. Габбасова, Ф. Х. Хазиев, Р. Р. Сулейманов // Почвоведение. – 2002. – № 10. – С. 1259–1273.
3. Сулейманов, Р. Р. Изменение свойств нефтезагрязненной серой лесной почвы в процессе биологической рекультивации / Р. Р. Сулейманов, И. М. Габбасова, Р. И. Ситдииков // Изв. РАН. Сер. биол. – 2005. – № 1. – С. 109–115.

4. *Хазиев, Ф. Х.* Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев // Ин-т биологии Уфим. НЦ. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
5. *Хазиев, Ф. Х.* Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активация разложения нефти / Ф. Х. Хазиев, Ф. Ф. Фатхиев // *Агрохимия*. – 1981. – № 10. – С. 102–111.
6. *Миненко, А. К.* Изменение биологической активности дерново-подзолистых почв при их окультуривании / А. К. Миненко; ВНИИ «Агроэкоинформ», 2009. – 16 с.
7. *Тарасевич, А. Ю.* Влияние загрязнения почв нефтью и дизельным топливом на культивируемые популяции навозных червей, их репродуктивную способность / А. Ю. Тарасевич // *Земляробства і ахова раслін*. – 2012. – № 2. – С. 25–27.
8. Environment Canada (EC). 2004. Biological Test Method: Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*) // Report EPS. – Ottawa, Ontario, 2004. – 184 p.
9. International Standard ISO 11268-3 (1999): Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). – Part 3: Determination of effects in field situations. International Organization for Standardization, Genf.
10. *Галицкая, П. Ю.* Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем: учеб.-метод. пособие / П. Ю. Галицкая, С. Ю. Селивановская, Р. Х. Гумерова. – Казань, 2011. – 47 с.
11. Фотометры фотоэлектрические КФК-3: руководство по эксплуатации. – М., 2004. – 42 с.

Поступила в редакцию 21.03.2016

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Редакция журнала «Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук» просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Если рукопись им не соответствует, статья не будет принята к рассмотрению.

I. Статьи о результатах работ, проведенных в научных учреждениях, должны иметь разрешение на опубликование (сопроводительное письмо ректората или дирекции соответствующего института либо выписку из протокола заседания ученого совета, отдела или кафедры, а также акт экспертизы).

II. Статья предоставляется в редакцию в двух экземплярах на белорусском, русском или английском языках; шрифт – Times New Roman, кегль – 11 (в том числе в формулах); межстрочный интервал – 1,5. Занумерованные формулы выключаются в отдельную строку. В тексте не допускаются рукописные вставки и вклейки. Статья должна быть подписана всеми авторами.

III. Статья должна иметь следующую структуру:

1. Индекс по Универсальной десятичной классификации (УДК);
инициалы и фамилии авторов;
название статьи;

полное наименование учреждений, где работают авторы, с указанием города и страны, адрес электронной почты каждого автора.

2. Аннотация (авторское резюме) объемом 150–250 слов должна кратко представлять результаты работы и быть понятной, в том числе и в отрыве от основного текста статьи; должна быть информативной, хорошо структурированной (один из вариантов написания аннотации – краткое повторение структуры статьи, включающее введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение или выводы).

3. Ключевые слова – набор слов, отражающих содержание текста в терминах объекта, научной отрасли и методов исследования; рекомендуемое количество ключевых слов 5–10.

4. Затем метатекстовые данные (все то, что предшествует основному тексту статьи) приводятся на *английском языке*, причем аннотация должна быть оригинальной (т. е. не являться дословным переводом русскоязычной аннотации). Если статья англоязычная – вышеуказанные данные приводятся на русском (белорусском) языке.

5. Основной текст статьи не должен превышать 16 с. (т. е. около 40 тыс. знаков); в этот объем также входят таблицы и рисунки (до 10). Изложенный материал должен быть четко структурированным: введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение (выводы). В русско- и белорусскоязычных статьях рекомендуется делать подрисуночные подписи и надписи на самих иллюстрациях на двух языках – *русском (белорусском) и английском*.

6. Список использованной литературы (не более 40 ссылок) оформляется в соответствии с требованиями Высшей аттестационной комиссии Республики Беларусь (ГОСТ 7.1-2003). Цитируемая литература приводится общим списком по мере упоминания, ссылки в тексте даются порядковым номером в квадратных скобках (напр., [1]); ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

7. Затем приводится список цитированных источников в *романском алфавите* (латиница) («References») со следующей структурой: авторы (транслитерация), название статьи в транслитерированном варианте [перевод названия статьи на английский язык в квадратных скобках], название русскоязычного источника (транслитерация) [перевод названия источника на английский язык – парафраз (для журналов можно не делать)], выходные данные с обозначениями на английском языке.

Примеры подготовлены по материалам методических рекомендаций «Редакционная подготовка научных журналов для включения в зарубежные индексы цитирования» О. В. Кирилловой (http://elsevierscience.ru/files/kirillova_editorial.pdf):

- **Статьи из журналов:**

Zagurenko A.G., Korotovskikh V.A., Kolesnikov A.A., Timonov A.V., Kardymon D.V. Tekhniko-ekonomicheskaya optimizatsiya dizaina gidrorazryva plasta [*Techno-economic optimization of the design of hydraulic fracturing*]. Neftyanoe khozyaistvo = Oil Industry, 2008, no.11, pp. 54-57.

- **Описание статьи из электронного источника:**

Swaminathan V., Lepkoswka-White E., Rao B.P. *Browsers or buyers in cyberspace? An investigation of electronic factors influencing electronic exchange*. Journal of Computer-Mediated Communication, 1999, vol. 5, no. 2. Available at: <http://www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/> (Accessed 28 April 2011).

- **Описание статьи с DOI:**

Zhang Z., Zhu D. *Experimental research on the localized electrochemical micromachining. Russian Journal of Electrochemistry*, 2008, vol. 44, no. 8, pp. 926-930. doi: 10.1134/S1023193508080077.

- **Описание статьи из продолжающегося издания (сборника трудов):**

Astakhov M. V., Tagantsev T. V. Eksperimental'noe issledovanie prochnosti soedinenii «stal'-kompozit» [Experimental study of the strength of joints "steel-composite"]. Trudy MGTU «Matematicheskoe modelirovanie slozhnykh tekhnicheskikh sistem» [Proc. of the Bauman MSTU "Mathematical Modeling of Complex Technical Systems"], 2006, no. 593, pp. 125-130.

- **Описание материалов конференций:**

Usmanov T. S., Gusmanov A. A., Mullagalin I. Z., Muhametshina R. Ju., Chervyakova A. N., Sveshnikov A. V. Osobnosti proektirovaniya razrabotki mestorozhdeniy s primeneniem gidrorazryva plasta [Features of the design of field development with the use of hydraulic fracturing]. Trudy 6 Mezhdunarodnogo Simpoziuma "Novye resursoberegayushchie tekhnologii nedropol'zovaniya i povysheniya neftegazootdachi" [Proc. 6th Int. Symp. "New energy saving subsoil technologies and the increasing of the oil and gas impact"]. Moscow, 2007, pp. 267-272.

- **Описание книги (монографии, сборники):**

Izvekov V. I., Serikhin N. A., Abramov A. I. Proektirovanie turbogeneratorov [Design of turbo-generators]. Moscow, MEI Publ., 2005, 440 p.

- **Описание Интернет-ресурса:**

APA Style (2011). Available at: <http://www.apastyle.org/apa-style-help.aspx> (accessed 5 February 2011).

Pravila Tsitirovaniya Istochnikov (Rules for the Citing of Sources) Available at: <http://www.scribd.com/doc/1034528/> (accessed 7 February 2011)

- **Описание диссертации или автореферата диссертации:**

Semenov V. I. Matematicheskoe modelirovanie plazmy v sisteme kompaktnyi tor. Diss. dokt. fiz.-mat. nauk [Mathematical modeling of the plasma in the compact torus. Dr. phys. and math. sci. diss.]. Moscow, 2003. 272 p.

- **Описание ГОСТа:**

GOST 8.586.5–2005. Metodika vypolneniia izmerenii. Izmerenie raskhoda i kolichestva zhidkosti i gazov s pomoshch'iu standartnykh suzhaiushchikh ustroystv [State Standard 8.586.5 – 2005. Method of measurement. Measurement of flow rate and volume of liquids and gases by means of orifice devices]. Moscow, Standartinform Publ., 2007. 10 p.

- **Описание патента:**

Palkin M. V., e.a. Sposob orientirovaniia po krenu letatel'nogo apparata s opticheskoi golovkoi samonavedeniia [The way to orient on the roll of aircraft with optical homing head]. Patent RF, no. 2280590, 2006.

8. Если присутствует информация о финансировании (поддержке грантами проектов и т. п.), ее следует давать на русском и английском языках под заголовками «Благодарности» («Acknowledgements»).

IV. Для подготовки метаданных (так называемый информационный лист) на отдельной странице следует указать на русском и английском языках для каждого автора: фамилию, имя и отчество (полностью), звание, должность, место работы с указанием адреса, контактную информацию (e-mail, телефоны).

V. Электронный вариант статьи предоставляется на диске, флэшке или присылается по электронной почте в редакцию журнала – biolvesti@mail.ru. Текст должен быть набран в Word под Windows, формулы – в редакторе MathType. Собственным редактором формул версий Microsoft Office 2007 и выше пользоваться нельзя, так как в редакционно-издательском процессе он не поддерживается. Вставку символов выполнять через меню «Вставка\Символ». Выключку вверх и вниз (C², C₄) выполнять через меню «Формат\Шрифт\Верхний индекс», «Формат\Шрифт\Нижний индекс». Латинские буквы необходимо набирать курсивом, греческие – прямо (для набора греческих символов следует пользоваться гарнитурой Symbol). Обозначения математических функций (lim, sup, ln, sin, Re, Im и т. п.), символы химических элементов (N, C1) также набираются прямым шрифтом.

VI. Черно-белые и цветные рисунки вставляются в текст статьи (Word), а также даются в виде отдельных файлов в формате tif (600 точек на дюйм). Желательно также предоставлять их в формате оригинала (Corel, диаграммы в Excel, Origin Pro и т. д.), т. е. в той программе, в которой они выполнены. Текст на рисунках набирается основной гарнитурой, причем начертание символов (греческое, латинское) должно соответствовать их начертанию в тексте. Размер кегля соизмерим с размером рисунка (желательно 8 пунктов). На обороте рисунков (если они даются отдельно) указываются фамилии авторов, название статьи. Фотографии предоставляются в виде файлов (tif, jpg, png, eps) и в распечатанном виде.

VII. Поступившая в редакцию статья направляется на рецензию, затем визируется членом редколлегии. Основным критерием целесообразности публикации является новизна и информативность статьи. Если по рекомендации рецензента статья возвращается автору на доработку, то переработанная рукопись вновь рассматривается редколлекцией. Статьи не по профилю журнала возвращаются авторам после заключения редколлегии.

Материалы для публикации следует направлять по адресу: ул. Академическая, 1, к. 119, редакция журнала «Весті НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук», 220072, г. Минск, Республика Беларусь либо по электронной почте: biolvesti@mail.ru. Тел. для справок: +375 17 284 19 19 (понедельник, среда, четверг).