

ФГБОУ ВПО «УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Н. УЛЬЯНОВА»

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ  
И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ БИОЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ  
ПО ПРИОРИТЕТНЫМ НАПРАВЛЕНИЯМ  
БИОЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ**

**МАТЕРИАЛЫ  
I МЕЖДУНАРОДНОЙ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**

**31 октября 2014 г.**

Ульяновск  
2014

УДК 57  
ББК 28.0  
Ф 94

Печатается по решению редакцион-  
но-издательского совета ФГБОУ ВПО  
«УлГПУ им. И.Н. Ульянова»

**Фундаментальные и прикладные исследования по приоритетным направлениям биоэкологии и биотехнологии:** материалы I Международной научно-практической конференции. Ульяновск, 31 октября 2014. – Ульяновск: ФГБОУ ВПО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова», 2014. – 184 с.

Fundamental and Applied Investigations on Priority Directions of Bioecology and Biotechnology: The Materials on Ist International Theoretical and Practical Conference. Ulyanovsk, 31st October 2014. – Ulyanovsk: UISPU, 2014. – 184 p.

В сборнике, опубликованы научные труды в которых представлены результаты исследований по актуальным направлениям фундаментальной и практической биоэкологии и биотехнологии.

**Оргкомитет конференции:**

Председатель: д.б.н., проф., в.н.с., директор Е.И. Антонова

**Члены оргкомитета:**

д.б.н., проф., в.н.с. Е.А. Артемьева  
к.б.н., доцент, с.н.с. О.Е. Беззубенкова  
к.б.н., доцент, с.н.с. И.С. Коняев  
к.б.н., доцент, с.н.с. Н.А. Ленгесова  
к.б.н., доцент, с.н.с., зав. лаб. А.В. Масленников  
к.б.н., доцент, с.н.с., зав. лаб. А.В. Мищенко  
к.б.н., доцент, с.н.с. А.В. Соловьев  
к.ф.-м.н., доцент, зав. лаб. А.В. Цыганов

**Рецензенты:**

д.б.н., проф., Б.Ф. Свириденко (директор НИИ экологии Севера Сургутского государственного университета Ханты-Мансийского автономного округа – Югры);  
д.вет.н., проф., В.И. Плешакова (зав. кафедрой ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина);  
д.вет.н., проф., А.А. Новицкий (профессор кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина).

ISBN 978-5-86045-773-7

ISBN 978-5-86045-773-7



9 785860 457737

УДК 57  
ББК 28.0

© Коллектив авторов, 2014  
© ФГБОУ ВПО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова», 2014  
© Издательство «Корпорация технологий продвижения», 2014

## ПРЕДИСЛОВИЕ

### УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

Сегодня мы представляем вашему вниманию первый сборник научных статей, подготовленных к первой международной научно-практической конференции, проводимой Научно-исследовательским центром фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова».

Научно-исследовательский центр (НИЦ) организован в педагогическом университете в целях реализации приоритетных направлений развития науки, техники и технологий РФ, утвержденных указом Президента РФ от 07 июля 2011 г. № 899. Модернизация инфраструктуры и создание материально-технической базы НИЦ УлГПУ проходила по программе стратегического развития вузов РФ 2012–2014 гг.

НИЦ осуществляет деятельность в научно-исследовательском, учебно-методическом и научно-образовательном направлении. Он включает в себя комплекс лабораторий, оснащённых современным, высокотехнологичным оборудованием для проведения научно-исследовательских работ в области молекулярной биологии, морфологии (гистология, цитология), биохимии и токсикологии, клеточных технологий, экологии и проблем биоразнообразия.

Основная цель организации НИЦ – повышение качества и эффективности фундаментальной, прикладной научно-исследовательской, учебно-методической и профессиональной деятельности, генерация доходов в целях повышения конкурентоспособности УлГПУ на рынке услуг научной, образовательной и инновационной деятельности.

Конечно, создавая этот, во многом уникальный для педагогического вуза Центр, в первую очередь мы думали о наших студентах, которые смогут на базе центра за период обучения получить все необходимые практические навыки и стать в будущем высококлассными профессионалами, а многие из них – серьезно увлечься научной деятельностью.

Есть еще одна актуальная задача, которую призван решать Центр, – это вопрос воспроизводства научно-педагогических кадров, сохранения

преемственности поколений в науке и образовании, повышения результативности научной деятельности научно-педагогических работников. Мы планируем проводить на базе центра лабораторные практикумы, спецкурсы, отдельные лабораторные занятия, реализовывать различные программы переподготовки кадров и повышения квалификации, в том числе межвузовского и международного обмена. Таким образом, центр будет использоваться как база и для подготовки высококвалифицированных научно-педагогических кадров, что возможно за счет тесного взаимодействия фундаментальной и прикладной науки с образовательным процессом.

При центре уже функционирует «Малая академия естественно-научного образования», деятельность которой направлена на выявление интеллектуального потенциала одарённых детей. Малая академия позволит нам реализовать мероприятия научной направленности сетевого взаимодействия «вуз-школа».

Немаловажно и то, что реализуемые на базе Центра проекты, носящие междисциплинарный характер, дают возможность повысить качество научных исследований и, как следствие, увеличить количество публикаций в изданиях в высокорейтинговых отечественных и зарубежных журналах, повысить индекса цитируемости наших ученых.

Не будем забывать о том, что сегодня для нас приоритетным становится развитие в вузе устойчивой образовательной и научно-исследовательской инфраструктуры, которая станет центром притяжения лучших интеллектуальных ресурсов региона, а также развития форм партнерства бизнеса, науки и государства.

Поздравляю всех авторов сборника с успешным стартом и желаю новых творческих научных побед!»

Ректор УлГПУ им. И.Н. Ульянова



Т.В. Десяткина

## СЕКЦИЯ 1. МОРФОЛОГИЯ

### ВЛИЯНИЕ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА МОРФОЛОГИЮ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ОРГАНАХ ДЫХАНИЯ КРЫС

#### THE INFLUENCE OF MICROGRAVITY ON THE MORPHOLOGY OF MAST CELL OF THE ORGAN OF RESPIRATORY SYSTEM OF RATS

Л.М. Ерофеева

L.M. Erofeewa

*ФГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России,  
Российская Федерация, Москва  
Moscow State University of Medicine and Dentistry named after  
A.I. Evdokimov, Russian Federation, Moscow*

**Summary.** Under the physiological conditions rapid degranulation is the preferred method of the degranulation of mast cells, the gradual degranulation, which most corresponds to the demands of the functional state of organ under the conditions of the action of the damaging factor, predominates after the action of micro-gravity.

**Введение.** Тучные клетки (ТК) – постоянный компонент рыхлой волокнистой соединительной ткани. Они обеспечивают поддержание гомеостаза, участвуют в защитных и аллергических реакциях [Fitzgerald et al., 2004; Plante et al., 2006]. Распределение ТК в организме неравно-мерно. Этими клетками особенно богата дерма кожи, собственная пластинка слизистой оболочки пищеварительного тракта, дыхательной, выделительной, половой систем. В среднем в рыхлой соединительной ткани их относительное содержание составляет 10% от общего числа клеток. Проявлением регуляторной функции ТК служит нарастание их количества в строме различных органов, функциональная активность которых повышается, вблизи и внутри очагов хронического воспаления, в опухолях и по периферии заживающих ран [Coulombe et al., 2002; Ogasawara et al., 1997; Tachibana et al., 2008]. При стрессе изменение тканевого метаболизма сочетается с изменением тонуса вегетативной нервной системы.

Обратная связь между компонентами тканевого метаболизма и отделами вегетативной нервной системы во многом опосредуется ТК.

В связи с этим изучение морфологии ТК при различных стрессовых состояниях является актуальным.

**Цель** настоящего исследования: изучение морфофункциональных изменений тучных клеток в органах дыхательной системы крыс при моделировании эффектов микрогравитации.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на половозрелых белых крысах самцах Вистар. Для создания эффектов микрогравитации использовали модель длительного (30 суток) вывешивания животных в однократном (1-ая группа) и повторном (2-ая группа) режимах. Путём мягкой фиксации за хвост животных фиксировали на подвижную основу так, что задние лапки на 1 см. были выше пола. Животных распределили на 3 группы по 10 особей в каждой. Крысы 1-ой опытной группы подвергались 30-ти суточному вывешиванию. Крысы 2-ой опытной группы после 30 дней вывешивания содержали в условиях вивария 30 суток, а затем повторно вывешивали на 14 суток. В 3-ю группу вошли контрольные животные, которых содержали в условиях вивария в течение всего эксперимента и выводили из эксперимента одновременно с опытными крысами. Материалом для исследования послужили: трахея и лёгкие. Материал фиксировали 10% нейтральным формалином. Парафиновые срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином-эозином и толуидиновым синим.

**Результаты.** Исследования показали неравномерное распределение тучных клеток в оболочках трахеи, а именно наибольшее их количество выявляется в перепончатой части фиброзно-хрящевой оболочки и в адвентиции. Показано увеличение количества выявляемых ТК в оболочках трахеи крыс 1-ой и 2-ой опытных групп, по сравнению с контролем. В лёгких ТК располагались периваскулярно, перибронхиально и в плевре. Выявлено увеличение числа ТК в периваскулярных зонах лёгких у экспериментальных животных, в наибольшей степени во 2-ой опытной группе, относительно контроля. Здесь обнаруживаются группы плотно расположенных ТК. Отмечено, что ТК находятся на разных стадиях дифференциации: 1-ая стадия – накопления, при этом в цитоплазме находятся единичные гранулы секрета; 2-ая стадия – набухания гранул, когда они полностью заполняют цитоплазму; и 3-я – стадия дегрануляции – выброс секрета из клетки.

Установлено, что в трахее крыс преобладают клетки на стадии дегрануляции. В лёгких же преобладают тучные клетки на стадии накопления секрета и на стадии дегрануляции.

Особого внимания заслуживает процесс выделения секрета тучными клетками, т.к. он зависит от состояния внутренней среды. Выделение секрета тучными клетками получило название «дегрануляция». Известны три способа дегрануляции: постепенная дегрануляция, экзоцитоз и быстрая дегрануляция. В функциональном отношении различные способы дегрануляции тучных клеток рассматривают как механизмы регулируемого выделения медиаторов, обеспечивающие адекватное их поступление во внутреннюю среду организма в зависимости от его функционального состояния [Яглова, Яглов, 2012]. При быстрой дегрануляции происходит выброс целых секреторных гранул в матрикс соединительной ткани, процесс постепенной дегрануляции сопровождается оводнением гранул и отделением от них мелких везикул, заполненных секреторным продуктом, после чего везикулы транспортируются к плазмолемме клетки и путем микроэкзоцитоза секрет выделяется за ее пределы. При экзоцитозе оводненные секреторные гранулы транспортируются к плазмолемме клетки в область поросомы, стыкуются с ней и выделяют секреторный продукт за пределы клетки. Этот способ может обеспечивать частичное многократное выделение секрета из секреторной гранулы.

Нами отмечено, что у контрольных животных преобладал способ быстрой дегрануляции, а у опытных выделение секрета из тучных клеток осуществлялось преимущественно способом постепенной дегрануляции. Что в наиболее полной мере отвечало потребностям органа. При повторном воздействии АНОГ численность тучных клеток в легких резко возрастает, что, по-видимому, характеризует значительное напряжение регуляторных механизмов в экстремальных для органа условиях.

Таким образом, исследование показало, что:

В условиях моделируемой микрогравитации достоверно увеличивается количество выявляемых тучных клеток в стенках трахеи и в легких, что обусловлено необходимостью поддержания гомеостаза тканей и местной регуляции;

Более значительное увеличение численности популяции тучных клеток в тканях легких при повторном воздействии происходит вследствие более выраженных изменений в органе, вызванных действием микро-гравитации;

Физиологических условиях преимущественным способом дегрануляции тучных клеток является быстрая дегрануляция, после воздействия микрогравитации преобладает постепенная дегрануляция, наиболее отвечающая запросам функционального состояния органа в условиях воздействия повреждающего фактора.

## Список литературы

1. Яглова Н.В., Яглов В.В. Биология секреции тучных клеток // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 4. – С. 4–10.
2. Coulombe M., Battistini B., Stankova J., Pouliot P., Bissonnette E.Y. Endothelins regulate mediator production of rat tissue-cultured mucosal mast cells. Up-regulation of Th1 and inhibition of Th2 cytokines // J. Leukoc. Biol. – 2002. – V. 71. – № 5. – P. 829–836.
3. Fitzgerald S.M., Lee S.A., Hall H.K., Chi D.S., Krishnaswamy G. Human lung fibroblasts express interleukin-6 in response to signaling after mast cell contact // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2004. – V. 30. – № 4. – P. 585–593.
4. Ogasawara T., Murakami M., Suzuki-Nishimura T., Uchida M.K., Kudo I. Mouse bone marrow-derived mast cells undergo exocytosis, prostanoid generation, and cytokine expression in response to G protein-activating polybasic compounds after coculture with fibroblasts in the presence of c-kit ligand // J. Immunol. – 1997. – V. 158. – № 1. – P. 393–404.
5. Plante S., Semlali A., Joubert P., Bissonnette E., Lavolette M., Hamid Q., Chakir J. Mast cells regulate procollagen I (alpha 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 delta 2 ratio // J. Allergy Clin. Immunol. – 2006. – V. 117. – № 6. – P. 1321–1327.
6. Tachibana M., Wada K., Katayama K., Kamisaki Y., Maeyama K., Kadowaki T., Blumberg R.S., Nakajima A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses mast cell maturation involved in allergic diseases // Allergy. – 2008. – V. 63. – № 9. – P. 1136–1147.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ С РАЗЛИЧНОЙ СИСТЕМОЙ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ

### CONTEMPORARY ANALYSIS OF MORPHOFUNCTIONAL ORGANIZATION OF LIVER IN ANIMALS OF DIFFERENT SYSTEMS OF THERMOREGULATION

**Е.И. Антонова<sup>1</sup>, А.И. Комарова, О.М. Костина**  
**E.I. Antonova<sup>1</sup>, A.I. Komarova, O.M. Kostina**

*Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных  
проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский  
государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова»,*

*Российская Федерация, Ульяновск*

*Research Center of Fundamental and Applied Problems of Bioecology  
and Biotechnology of the Ulyanovsk State Pedagogical University,*

*Russian Federation, Ulyanovsk*

*<sup>1</sup>E-mail: antonov\_67@mail.ru*

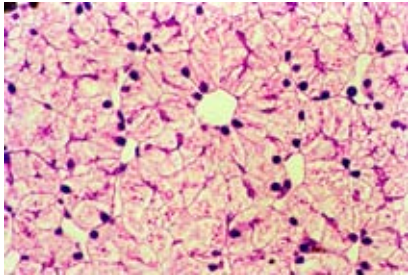
**Summary.** The functioning of the liver occurs in conditions of high concentrations of toxic substances of exogenous and endogenous origin. Under these conditions, the liver function is ensured through close cooperation

between parenchymal and nearendemic of citation body. Therefore, the study of the regularities of structural-functional organization of the liver, the analysis of adaptive rearrangements, as well as identifying the mechanisms of regeneration is one of the urgent problems of fundamental and applied evolutionary developmental biology.

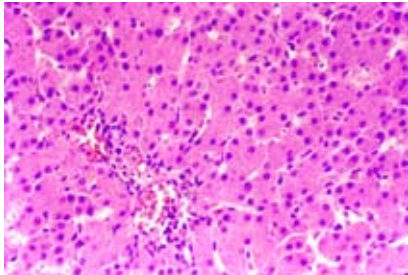
Изучение закономерностей становления в эволюции реактивности и пластичности функционально-аналогичных тканей с позиции теории параллелизма – фундаментальная задача современной биологии. В связи с этим **целью** нашей работы является изучить в сравнительном аспекте морфофункциональные особенности организации печени, как органа обеспечивающего поддержание гомеостаза организма, у животных с различной системой терморегуляции.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводили на двух видах животных – амфибии вида *Rana terrestris* Andrzejewski, 1832 (*Rana arvalis* Nilsson, 1842) и птицы вида *Columba livia* (forma domestica) Gmelin, 1789. Эксперимент был поставлен на 15 половозрелых самцах трехлетках амфибий и 15 самцах сизых голубей, шести месяцев постнатального развития вида. Полученные образцы печени фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине и заливкой в парафин [Коржевский, Гиляров, 2010]. Для изучения васкуляции и гистотопографии печени срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином [Валовая, Кавтарадзе, 1993]. Иммунофенотипирование клеток печени, пространственную топографию, процессы пролиферации и полиплоидизации осуществляли согласно Протокола HIAR (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновым методом (LSAB), хромоген АЭК. В работе использовались антитела: к PCNA (ДАКО), к десмину активированных клеток Ито (ДАКО). Выявление популяции активированных тканевых макрофагов проводили гистохимически путем окрашивания эндогенной пероксидазы клеток Купфера раствором аминоэтилкарбозола (АЭК) и последующим докрасиванием ядер гематоксилином и заключением препарата в глицерин-желатине [Киясов, 1998].

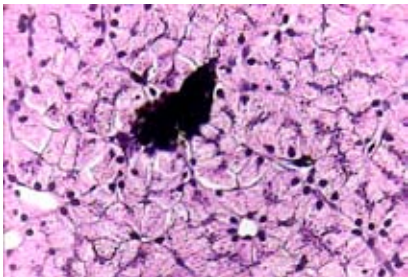
Статистическую обработку полученного материала осуществляли с помощью пакета программ «Statistica 6». Полученные данные статически обрабатывались с определением среднего значения, среднеквадратичного отклонения с дальнейшим определением уровня значимости различий при  $p=0,05$  между средними величинами по критерию Стьюдента для параметрического распределения показателей. Для выявления степени сопряженности исследуемых показателей применялся корреляционный анализ Пирсона.



**Рисунок 1.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ок10 х об40. Трубочатое строение паренхимы.



**Рисунок 2.** Печень птиц вида *Columba livia*. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ок10 х об40. Область портального тракта.



**Рисунок 3.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ок10 х об40. Пигментные клетки в области портального тракта.

**Собственные данные и их об-суждение.** Сравнительный анализ гистотопографии печеночного ацинуса выявил, что в эволюции тканевая организация печени изменяется от трубчатого типа у амфибий (рис. 1), к трубчато-трабекулярному у птиц (рис. 2). Так же от пойкилотермных к гомойотермным животным увеличивается количественная плотность печёночных ацинусов, что свидетельствует об интенсивных процессах метаболизма и становления в эволюции полифункциональности органа [Антонова, 2009].

В печени амфибий выявлено наличие большого количества пигментных клеток, являющихся видоизмененными клетками Купфера, которые могут формировать мелано-макрофагальные центры, функции которых – депонирование и утилизация продуктов катаболизма (рис. 3).

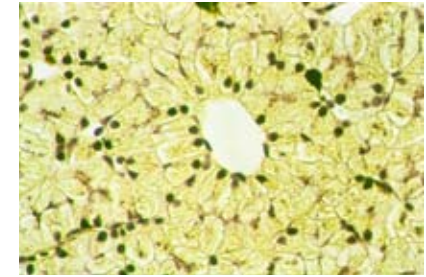
У птиц и амфибий (рис. 4 и 5) соединительной ткани, которая образует капсулу органа и даёт прослойки внутри печени мало, в строении паренхимы ацинуса птиц отмечается формирование коротких трабекул гепатоцитов расположенных в два ряда, как у млекопитающих.

Функциональные возможности адаптации животных с различной системой терморегуляции к условиям внешней среды отражает ряд морфометрических показателей (рис. 6). Так, внутрен-

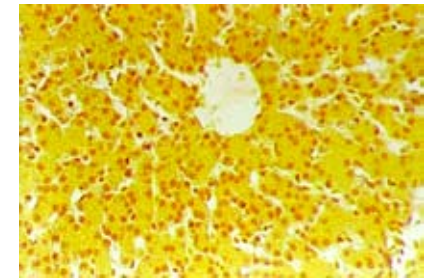
ний диаметр артериолы, больше в группе эндотермных животных, это связано с потребностью птиц в большом количестве кислорода, необходимого для окислительно-восстановительных процессов, происходящих в митохондриях, что, в свою очередь, обеспечит образование большого количества АТФ, которая участвует в процессе терморегуляции, проявляющейся в постоянстве высокой (40°C) температуры тела.

У птиц также более высокие показатели просвета лимфатических сосудов, желчного протока, это указывает на более высокую интенсивность метаболических реакций, происходящих в этой группе животных; дренажно-иммунологической функции и лимфообращения в печени, выравниванием ионного баланса между внутриклеточным и внеклеточным пространством.

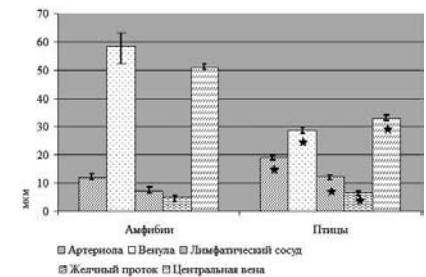
В свою очередь, просвет венозного звена и синусоидных капилляров печеночного ацинуса выше в группе амфибий (рис. 7). Скорость кровотока в таких капиллярах невысокая, повышено гидростатическое давление, возрастает проницаемость эндотелиальной оболочки для выхода плазмы в пространство Диссе обеспечивая медленный гемато-паренхимный обмен, является эволюционной адаптацией к естественной гипоксии и реоксигенации свойственной для физиологических условий для данной группы организмов.



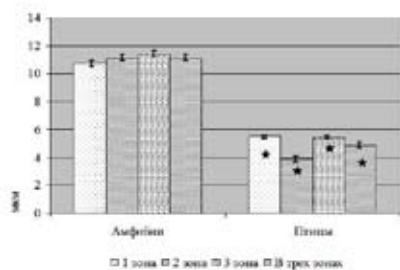
**Рисунок 4.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Окраска Ван-Гизон. Увеличение ок10 х об40. Область портального тракта.



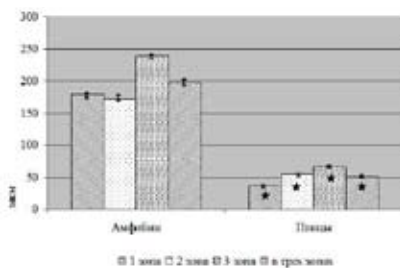
**Рисунок 5.** Печень птиц вида *Columba livia*. Окраска Ван-Гизон. Увеличение ок10 х об40. Область портального тракта.



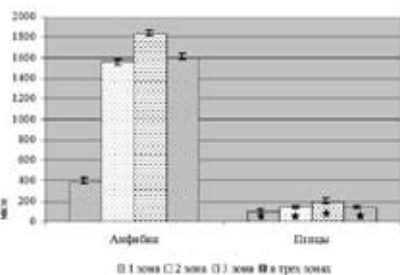
**Рисунок 6.** Показатели микроциркуляторного русла печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  – t-критерий Стьюдента).



**Рисунок 7.** Диаметр синусоидных капилляров в пределах печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  –  $t$ -критерий Стьюдента).



**Рисунок 8.** Объем ядер гепатоцитов в пределах печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  –  $t$ -критерий Стьюдента).



**Рисунок 9.** Объем цитоплазмы гепатоцитов в пределах печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  –  $t$ -критерий Стьюдента).

Объемные соотношения показателей цитоплазмы и ядра гепатоцитов (рис. 8 и 9), отражают физиологические параметры органа с позиции адаптации организма к среде обитания, определяют интенсивность метаболизма, регулируемого на генетическом уровне через экспрессию генов [Патрушев, Минкевич, 2007]. Так в обеих группах животных прослеживается порто-венулярный градиент в размерах ядер и объема цитоплазмы гепатоцитов. При этом показатели группы амфибий в несколько раз превышают показатели группы птиц. Столь высокая разница объясняется тем, что объем ядер значительно коррелирует с размером генома [Виноградов, 2011]. В свою очередь, обеспечение функциональности крупных ядер требует более масштабной работы компонентов цитоплазмы (митохондрий и т.д.). В связи с этим соотношение объема ядра и цитоплазмы гепатоцитов эволюционно оптимизировано.

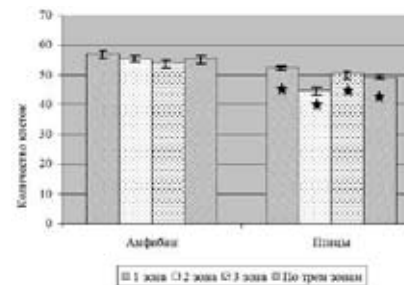
Количество одноядерных гепатоцитов увеличивается в венуло-портальном направлении. Наибольшее количество одноядерных гепатоцитов выявлено в перипортальной зоне у обеих групп животных. При этом большее количество одноядерных гепатоцитов отмечается в группе амфибий (рис. 10).

Анализ количественных показателей цитотипов печени позволил выявить, что репродуктивно-пролиферативной зоной у обеих

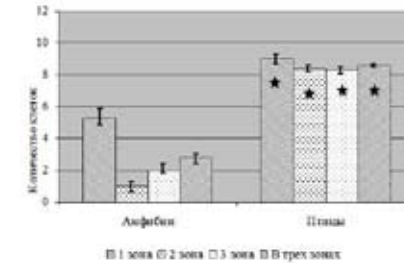
групп животных является перипортальная (за счет ацитокинетических митозов) и большого количества PCNA-позитивных гепатоцитов, которые являются показателями как полиплоидизации, так и репарации ДНК (рис. 11 и 12)

В группе амфибий характер распределения двуядерных гепатоцитов в пределах ацинуса носит венуло-портальный градиент, то есть максимальное количество выявлено в перивенулярной зоне. У птиц же, наоборот, максимальное количество двуядерных гепатоцитов выявлено в области портального тракта (рис. 13).

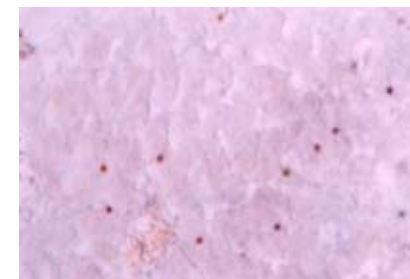
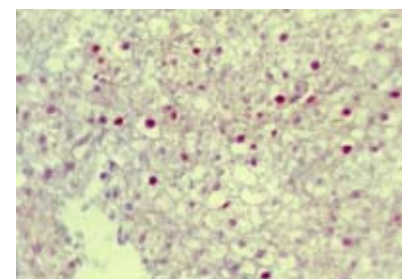
Процесс регенерации гепатоцитов регулируется двумя цитокоммуникативными механизмами: аутокринно и паракринно [Антонова, 2009]. Так, наряду с большим количеством двуядерных гепатоцитов, на фоне высокой активности ацитокинетических митозов у амфибий, выявлено большое количество пероксидазо-позитивных клеток Купфера. Их распределение



**Рисунок 10.** Абсолютное количество одноядерных гепатоцитов печени в пределах печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  –  $t$ -критерий Стьюдента)



**Рисунок 11.** Абсолютное количество PCNA-позитивных гепатоцитов в пределах печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  –  $t$ -критерий Стьюдента)



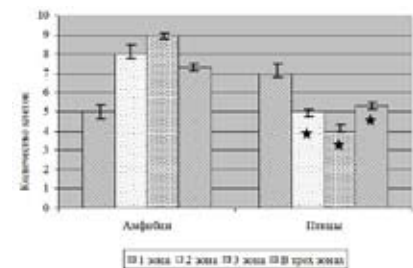
**Рисунок 12.** Печень. Увеличение ок10 х об20. Окрашивание пролиферирующих гепатоцитов антителами к PCNA. Область центральной вены амфибий (слева) и птиц (справа).

примерно одинаково в трех зонах печеночного ацинуса. Тем не менее, отмечается преобладание органоспецифичных макрофагов в центрлобулярной зоне, у птиц – в области портального тракта (рис. 14 и 15).

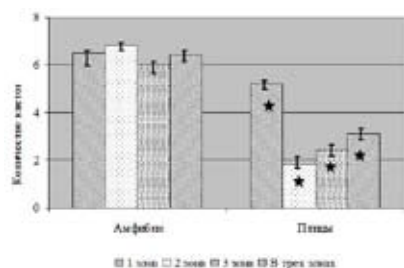
Максимальное количество десмин-позитивных клеток Ито выявлено в группе птиц, при этом выявляются отличительные особенности в локализации клеток Ито у представителей обеих групп животных. У амфибий преобладающее количество десмин-позитивных клеток Ито обнаружено в перивенулярной зоне, у птиц – в центрлобулярной зоне печеночного ацинуса (рис. 16 и 17).

Корреляционный анализ исследуемых показателей в пределах трех зон обеих групп животных выявил следующие сопряженности (рис. 18):

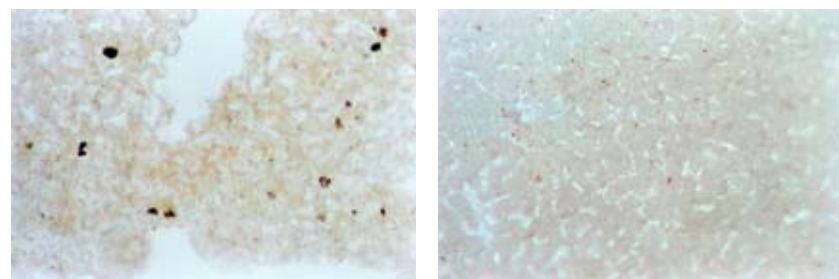
В перипортальной зоне у птиц количество десмин-позитивных клеток Ито положительно коррелирует с количеством пероксидазо-позитивных клеток Купфера, которые в активном состоянии обеспечивают детоксика-



**Рисунок 13.** Абсолютное количество двуядерных гепатоцитов печени в пределах печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  – t-критерий Стьюдента).



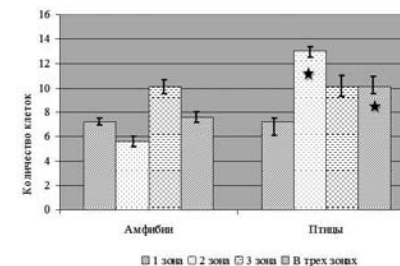
**Рисунок 14.** Абсолютное количество пероксидазо-позитивных клеток Купфера у амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* в пределах печеночного ацинуса (примечание: \* $p=0,05$  – t-критерий Стьюдента).



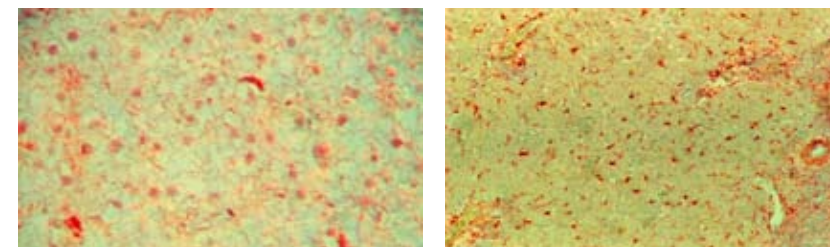
**Рисунок 15.** Печень. Увеличение ок10 х об20. Гистохимическое окрашивание на пероксидазу клеток Купфера. Область центральной вены амфибий (слева) и область портального тракта птиц (справа).

цию эндотоксинов бактериального происхождения, а также участвуют в образовании целого ряда цитокинов [Пинегин, Карсонова, 2009], которые определяют увеличение пролиферативной активности гепатоцитов и активацию клеток Ито.

В центрлобулярной зоне печеночного ацинуса в группе амфибий же выявляется положительная аутокринная сопряженность между количеством двуядерных и PCNA-позитивных гепатоцитов. В перивенулярной зоне наблюдается тесная сопряженность между количеством двуядерных и PCNA-позитивных гепатоцитов (как и в центрлобулярной зоне группы амфибий). С уменьшением количества одноядерных гепатоцитов паракринно положительно сопряжено увеличение количества пероксидазо-позитивных клеток Купфера, по всей видимости за счет цитокинов которые высвобождаются в



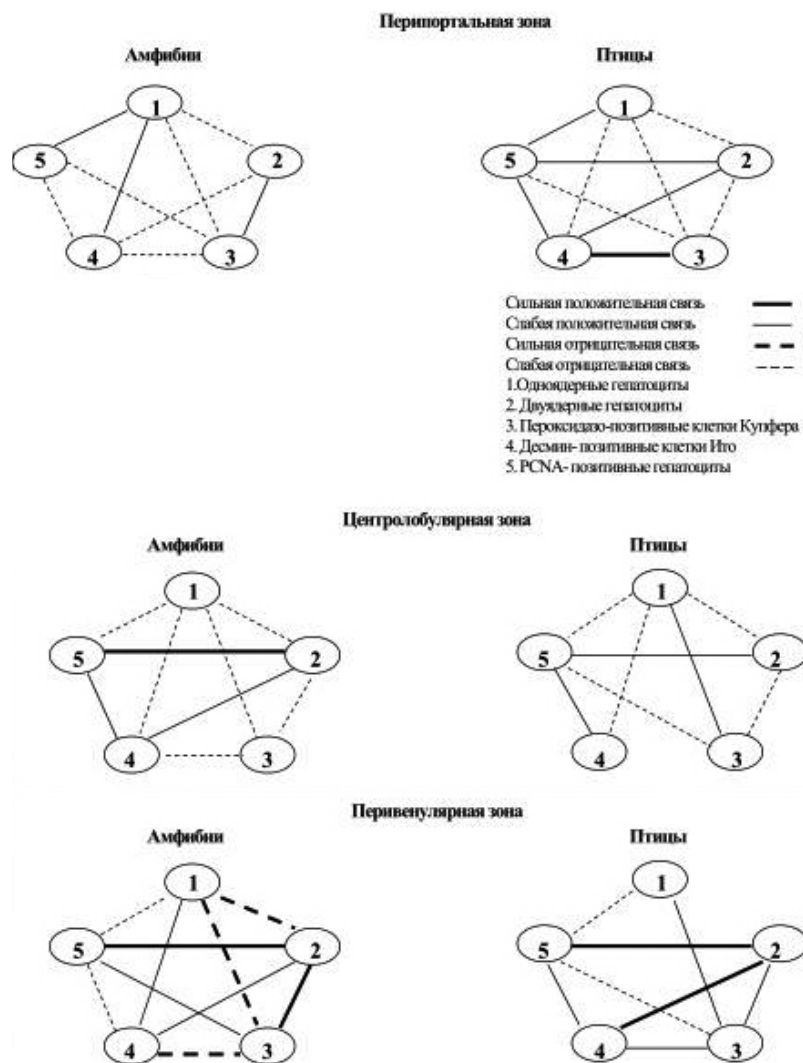
**Рисунок 16.** Абсолютное количество десмин-позитивных клеток Ито в пределах печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: \* $p=0,05$  – t-критерий Стьюдента).



**Рисунок 17.** Печень. Увеличение ок10 х об40 (слева), ок10 х об20 (справа). Окрашивание антителами к десмину. Центрлобулярная зона амфибий (слева) и печеночный ацинус птиц (справа).

результате повреждения мембран гепатоцитов. В свою очередь увеличение числа пероксидазо-позитивных клеток Купфера положительно коррелирует с количеством двуядерных гепатоцитов. В сравнительном аспекте активация клеток Купфера проявляется в меньшей мере по сравнению с уровнем активации десмин-позитивных клеток Ито, в связи с этим между этими показателями формируется отрицательная тесная сопряженность.

В перивенулярной зоне группы птиц наблюдается тесная сопряженность между: двуядерными и PCNA-позитивными гепатоцитами (как и в перипортальной зоне у амфибий); количеством двуядерных гепатоцитов и числом десмин-позитивных клеток Ито. Данная сопряженность



**Рисунок 18.** Динамика цитокоммуникаций в пределах трех зон печеночного ацинуса амфибий вида *Rana terrestris* и птиц вида *Columba livia* (примечание: при  $r \leq 0,7$ ,  $p^* = 0,05$ ).

обеспечивается цитокинами которые синтезируются активированными клетками Ито: фактор роста гепатоцитов (HGF), TGF- $\alpha$ , которые определяют увеличение митотической активности гепатоцитов.

Полученные нами данные позволяют сделать заключение о том, что в процессе эволюции у животных с различной системой терморегуляции, гистотопография печеночного ацинуса эволюционно меняется от трубчатого типа у амфибий, к трубчато-трабекулярному у птиц. Высокая интенсивность окислительно-восстановительных процессов и, как следствие, эндотермная система терморегуляции у птиц определяется состоянием артериального звена ацинуса, а показатели венозного звена и системы капилляров определяют у амфибий адаптации к естественной гипоксии и реоксигенации. Отмечается эволюционно сформированные закономерности – наличие максимального количества тканевых макрофагов в области портального тракта у птиц для поддержания регионального иммунитета органа, у амфибий такой зоной является центрлобулярная область, так как именно в этой зоне происходит поглощение и интенсивная детоксикация ксенобиотиков.

Десмин-позитивных клеток Ито более всего у амфибий в перивенулярной, а у птиц в центрлобулярной зоне, что связано с особенностями реконструкции внеклеточного матрикса (ВКМ) в пределах зон печеночного ацинуса.

Паренхимный источник физиологической регенерации у обеих групп животных формируют в области портального тракта зону повышенной локализации PCNA-позитивных гепатоцитов. Зоной максимальной локализации митотически делящихся гепатоцитов у амфибий является область центральных вен, у птиц – область портального тракта.

#### Список литературы

1. Антонова Е.И. Реактивность и пластичность тканевых компонентов печени в сравнительном ряду позвоночных в норме и после гипертермии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Астрахань, 2009. – 44 с.
2. Валовая М.А., Кавтарадзе Д.Н. Микротехника правила приема, искусство эксперимента. – М.: Московский Университет, 1993. – 240 с.
3. Виноградов А.Е. Функциональное значение базовых свойств структуры генома эукариот: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Санкт-Петербург, 2011. – 35 с.
4. Киясов А.П. Методы иммуногистохимии. Иммуногистохимическая диагностика опухолей человека / Руководство для врачей-морфологов. – Казань, 1998. – С. 9–34.
5. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.
6. Патрушев Л.И., Минкевич И.Г. Проблема размера геномов эукариот // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 293–370.
7. Пинегин Б. В., Карсонова М. И. Макрофаги: свойства и функции // Иммунология. – 2009. – Т. 30. – № 4. – С. 241–249.

**МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ТКАНЕВОГО ГОМЕОСТАЗА  
В ПЕЧЕНИ ПТИЦ СИНАНТРОПОВ УРБОБИОЦЕНОЗОВ  
И ГИБРИДНЫХ ФОРМ КРОСС-ЛИНИЙ КУР  
В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ**

**MECHANISM FOR MAINTAINING TISSUE HOMEOSTASIS  
IN POLTRY LIVER SINANTHROPUS URBOBIOTSENOZOV  
AND HYBRID FORMS CROSS LINES CHICKEN IN  
EMBRYOGENESIS**

**Л.Е. Хамитова<sup>1,2</sup>, Е.И. Антонова<sup>3</sup>, О.З. Мкртчян<sup>1</sup>  
L.E. Khamitova<sup>1,2</sup>, E.I. Antonova<sup>3</sup>, O.Z. Mkrтчan<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет»,  
Российская Федерация, Омск  
Omsk State Pedagogical University, Russian Federation, Omsk  
<sup>2</sup> E-mail: sagalbaeva@mail.ru

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет  
им. И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk

**Summary.** Comparative analysis of tissue homeostasis hepatic acinus revealed that the periportal zone at the early stage of embryogenesis in both groups of birds is "cambial"; the largest number of p53-positive hepatocytes in broilers are revealed; both programs hepatocyte death are equally implemented. In centrolobular area in both groups of birds a large number of PCNA-positive hepatocyte was identified (I type of death is realized); a high amount LC3A / B-positive hepatocytes (II type of death) in broiler chickens was found additionally. In perivenular zone in *Columba livia* II type of death occurs together with a high number of p53-positive hepatocytes.

**Введение.** Изучение особенностей регенерации органов и тканей организма представляет актуальную медико-биологическую проблему фундаментального и прикладного характера. Одним из таких органов является печень, которая участвует в поддержании гомеостаза организма, осуществляет межсистемную кооперацию в организме. Процесс регенерации печени, с позиции клеточного гомеостаза, включает в себя анализ пролиферативной активности гепатоцитов и анализ реализации различных путей ПКГ (программируемая клеточная гибель) гепатоцитов [Манских, 2007; Ельчанинов, Большаков, 2012]. Современные исследова-

ния среди путей ПКГ выделяют апоптоз (ПКГ I типа) и аутофагию (ПКГ II типа). В регуляции процессов ПКГ участвует множество различных факторов, в том числе протоонкоген семейства bcl-2 и ген p53, которые рассматриваются как биологические маркеры процесса клеточной гибели [Желтухин, Чумаков, 2010]. Актуальным является изучение такого фактора процессивности как PCNA, который определяет пролиферативную активность клеток.

С этих позиций, актуально исследование механизмов поддержания тканевого гомеостаза у птиц в эмбриональном онтогенезе, так как именно в этот период отмечается дефицит парциального содержания кислорода, несформированность системы терморегуляции и толерантная стратегия метаболической адаптации что влияет на процессы закладки и эмбриональный морфогенез печени [Дудин и др., 2011; Кулинский, Ольховский, 1992; Родимцев, 2004]. В связи с этим **целью** нашей работы является изучить в сравнительном аспекте механизмы поддержания тканевого гомеостаза в печени птиц на раннюю стадию эмбрионального развития у птиц синантропов урбобиоценозов и гибридных кросс-линий кур.

**Материалы и методика.** Эксперимент поставлен на 2 группах птиц: голуби *Columba livia* (forma domestica) Gmelin, 1789 – группа с естественной гибридизацией, синантропные виды; куры-бройлеры четырехлинейного кросса «РОСС-308» (родительские линии породы корниш кросса ROSS 78F и ROSS 14M) – группа с искусственной гибридизацией. Согласно литературным данным ранняя стадия эмбриогенеза, на которую проводился забор материала для исследований, в группе *Columba livia* приходится на 16 сутки, для кур-бройлеров – 14 сутки [Дудин и др., 2011; Родимцев, 2004]. Анализ путей ПКГ и их регуляторов, пролиферативной активности гепатоцитов проводили иммуногистохимически, стрептавидин-биотиновым методом. В работе использовали антитела к белкам-маркерам: PCNA (Novocastra, Германия); LC3A/B (Abcam, Великобритания); CPP32, p53 и bcl-2 (Novocastra, Германия). Морфометрический анализ препаратов проводили на световом микроскопе AxioImager A1 с помощью программного обеспечения Axiovision rev. 4.7. («Carl Zeiss», Германия). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA-6». Различия считались значимыми при  $p=0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Анализируя показатели пролиферации, выявлено, что распределение и количество PCNA-позитивных гепатоцитов у кур-бройлеров носит порто-венулярный градиент, тогда как у *Columba livia* в большей мере в центролобулярной зоне (рис. 1). Сравнительный межгрупповой статистический анализ выявил, что у кур-

бройлеров, в сравнении с *Columba livia*, количество PCNA-позитивных гепатоцитов в перипортальной зоне ацинуса на 40% больше, но в перивенулярной – на 23% меньше.

Анализируя реализацию различных программ ПКГ и их регуляцию, определено, что в обеих группах птиц CPP32-позитивные гепатоциты в большей мере локализованы в центролобулярной зоне. В тоже время согласно сравнительному межгрупповому статистическому анализу, у кур-бройлеров в области портального тракта количество CPP32-позитивных гепатоцитов значимо больше (рис. 1), чем у *Columba livia*. Тогда как количество LC3A/B-позитивных гепатоцитов в группе *Columba livia* (рис. 1), на 45% меньше в перипортальной и центролобулярной зонах ацинуса. Межгрупповой статистический анализ выявил, что в группе кур-бройлеров, в сравнении с *Columba livia*, значимо большее число p53-позитивных гепатоцитов на 32% в перипортальной (рис. 1), в перивенулярной на 48% меньше. Зонной локализации Bcl-2-позитивных гепатоцитов (рис. 1), в обеих группах птиц, является область портального тракта (порто-венулярный градиент), и согласно межгрупповому статистическому анализу у *Columba livia* количество данной популяции гепатоцитов значимо больше в перивенулярной зоне ацинуса, чем в группе кур-бройлеров.

Таким образом, согласно зональной организации печеночного ацинуса – большее количество погибших гепатоцитов в обеих группах птиц определяется в центролобулярной зоне. Но если у *Columba livia* активации экспрессии гепатоцитами изучаемых регуляторов ПКГ не выявлено и ведущим путем гибели гепатоцитов является апоптоз, о чем можно судить по количеству CPP32-позитивных гепатоцитов, то у кур-бройлеров на фоне высоких показателей p53-позитивных гепатоцитов гибель гепатоцитов в равной мере реализуется по I и II пути [Scherz-Shouval et al., 2010]. Реализация I пути гибели гепатоцитов у обеих групп птиц соотносится с высокими показателями количества PCNA-позитивных гепатоцитов.

В перивенулярной зоне – II тип гибели гепатоцитов, исходя из количества LC3A/B-позитивных гепатоцитов, у *Columba livia* реализуется на фоне высокого количества p53-позитивных гепатоцитов. Таким образом, если в группе кур-бройлеров активация аутофагии выявлена в центролобулярной зоне, то в группе *Columba livia* – в области центральных вен. По всей видимости, в условиях недостатка питательных веществ, p53 регулирует синтез белка LC3A/B – одного из ключевых участников процесса аутофагии [Желтухин, Чумаков, 2010].

В области портального тракта: у кур-бройлеров на фоне активации экспрессии гепатоцитами белка p53 реализуется программа I пути гибели

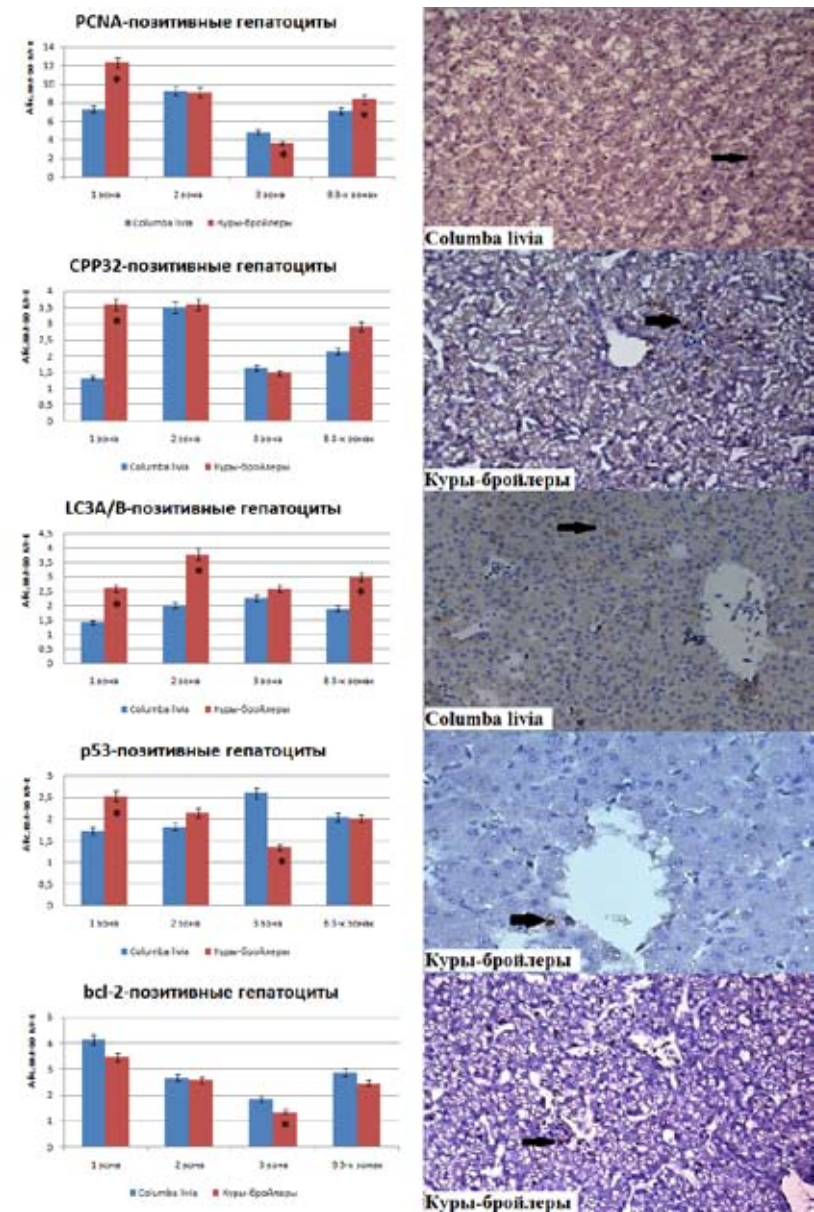


Рисунок 1. Сравнительное иммуногистохимическое фенотипирование гепатоцитов в состоянии ПКГ, пролиферации.

гепатоцитов, тогда как в группе *Columba livia* наоборот – минимальное количество СРР32-позитивных соотносится с наибольшим количеством р53- и bcl-2-позитивных гепатоцитов. Известно, что белок bcl-2 служит фактором выживания гепатоцитов, защищая ее от запрограммированной гибели, проявляя онкогенный эффект, так как способен подавлять апоптоз путем регулируемого переноса  $Ca^{2+}$  через мембрану ЭПР [Heath-Engel et al., 2012]. Выявленные у кур-бройлеров высокие показатели экспрессии белка р53 не только регулируют реализацию путей ПКГ, но участвуют в регуляции процессов метаболизма и активности АОС [Желтухин, Чумаков, 2010]. У кур-бройлеров в области портального тракта, также как и в центроробулярной зоне, выявлено большое количество PCNA-позитивных гепатоцитов.

**Заключение.** На основании вышесказанного можно заключить, что на раннюю стадию эмбрионального развития у кур-бройлеров в перипортальной зоне ацинуса отмечается наибольшее количество PCNA-позитивных гепатоцитов, реализуются I путь гибели на фоне высокого количества р53-позитивных гепатоцитов. В центроробулярной зоне гибель гепатоцитов в равной мере реализуется по I и II пути. В группе *Columba livia* I и II тип гибели гепатоцитов, в перивенулярной зоне реализуется на фоне высокой экспрессии гепатоцитами белка р53. Наибольшее количество PCNA-позитивных гепатоцитов у обеих групп птиц выявлено в центроробулярной зоне ацинуса.

#### Список литературы

1. Дудин В.И., Микулец Ю.И., Егоров И.А. Причины смертности куриных эмбрионов // Птицеводство. – 2011. – № 03. – С. 4–5.
2. Ельчанинов А.В., Большаков Г.Б. Пролиферация и клеточная гибель гепатоцитов регенерирующей печени плодов крыс // Цитология. – 2012. – Т. 54. – № 4. – С. 313–317.
3. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена р53 // Успехи биологической химии. – 2010. – Т. 50. – С. 447–516.
4. Кулинский В.И., Ольховский И.А. Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях – резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов // Успехи современной биологии. – 1992. – № 6. – С. 697–714.
5. Манских В.Н. Пути гибели клеток и их биологическое значение // Цитология. – 2007. – Т. 49. – № 11. – С. 909–915.
6. Родимцев А.С. Этапность и критические периоды раннего онтогенеза птенцовых птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Москва, 2004. – 41 с.
7. Heath-Engel H.M., Wang B., Shore G.C. Bcl2 at the endoplasmic reticulum protects against a Bax/Bak-independent paraptosis-like cell death pathway initiated via p20Bap31 // Biochim Biophys Acta. – 2012. – Vol. 1823(2). – P. 335–347.
8. Scherz-Shouval R., Weidberg H., Gonen C., Wilder S., Elazar Z., Oren M. p53-dependent regulation of autophagy protein LC3 supports cancer cell survival under prolonged starvation // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. – 2010. – Vol. 107 (43). – P. 18511–18516.

## ТКАНЕВЫЙ ГОМЕОСТАЗ ПЕЧЕНИ АМФИБИЙ В РАННИЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ГИПЕРТЕРМИИ

### TISSUE HOMEOSTASIS LIVER AMPHIBIANS IN THE EARLY RECOVERY PERIOD AFTER THE ACTION OF HYPERTHERMIA

Е.И. Антонова<sup>1</sup>, О.Ю. Шпак<sup>2</sup>, О.З. Мкртчян<sup>2</sup>  
E.I. Antonova<sup>1</sup>, O.J. Shpak, O.Z. Mkrtychyan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии Ульяновского государственного педагогического университета имени И.Н. Ульянова, Российская Федерация, Ульяновск  
Research Center of Fundamental and Applied Problems of Bioecology and Biotechnology of the Ulyanovsk State Pedagogical University named after I.N. Ulyanov, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: antonovaei1@rambler.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет»,  
Российская Федерация, Омск  
Omsk State Pedagogical University, Russian Federation, Omsk

**Summary.** In the early recovery period after exposure of hyperthermia in amphibian *Rana terrestris* the mediated autocrine and paracrine conjugation sources reparative regeneration of hepatic acinus appear topographically: in the periportal zone – activation of CD-68 positive organ specific macrophages, desmin-positive cells Ito; in tsentrolobulyarnoy – activated and inhibited proliferation process perivenular PCNA-positive hepatocytes. At the same time, two programs hepatocyte death runs in amphibians: autophagy and apoptosis in all areas of the acinus.

Основой функционирования всех систем организма является поддержание его биологической целостности. На клеточном уровне этот процесс реализуется за счет регуляторного влияния эфферентных сигналов, поддерживающих сложное равновесное состояние между интегративными физиологическими процессами: пролиферацией, дифференцировкой и физиологической клеточной гибелью. Известно, что механизм программируемой клеточной гибели обеспечивает уравнивание эффекта пролиферации и элиминации клеточной популяции, в частности клеток

печени – гепатоцитов [Charles et al., 2005]. В свою очередь, реакции адаптации организма к стрессорным факторам среды обитания проявляются на уровне поддержания внутренней среды организма. Пребывание организма в условиях гипертермического воздействия может приводить к метаболическим и функциональным изменениям, которые, в свою очередь, оказывают негативное влияние на характер жизнедеятельности отдельных органов [Лямзаев, 2007; Somero, 2002]. При этом особое значение приобретает состояние органов, непосредственно участвующих в поддержании гомеостаза организма. Одним из таких органов является печень – уникальный метаболический барьер, предназначенный для охраны чистоты внутренней среды организма в процессе взаимодействия «организм – среда» [Liu et al., 2000].

Поддержание тканевого гомеостаза в процессе регенерация печени реализуется благодаря межклеточным стромально-паренхимным цитокоммуникациям и сопровождается не только со стороны изменения топографии и морфологии гепатоцитов в пределах ацинуса, но и с позиции запуска регуляторов ПКГ (программируемая клеточная гибель) гепатоцитов [Лямзаев, 2007; Романова, 2008]. Безусловно, сложность структуры, полифункциональность, быстрота вовлечения печени в деструктивные и репаративные процессы – все это определяет неослабевающий интерес исследователей к проблемам ее регенерации, а также зависимости путей гибели клеток паренхимы и механизмов их восстановления на разных уровнях организации биологических систем, как на фоне физиологической нормы, так и в ранний восстановительный период после воздействия гипертермии [Антонова, 2008; Реброва, 2002; Романова, 2008].

Особый интерес вызывает изучение тканевого гомеостаза амфибий, которые являются ключевым звеном в водных экосистемах [Зданович, 2007] и наиболее чувствительными к изменению внешних факторов, при этом представляют собой класс, делающий определенный прорыв в совершенствовании системы адаптивного иммунитета [Zhu, 2010]. На сегодняшний день не в полной мере разработаны как экспериментальные приемы гипертермии (тепловой шок), так и теоретические основы механизмов воздействия гипертермии на организм амфибий [Чумаков, 2007]. В связи с этим **целью** нашей работы выявить механизмы поддержания тканевого гомеостаза печени посредством стромально-паренхимных цитокоммуникаций и механизмов регуляции танатогенных программ гепатоцитов у амфибий вида *Rana terrestris* в условиях физиологической нормы и после действия гипертермии в ранний восстановительный период.

**Материал и методы исследования.** Эксперимент поставлен на половозрелых 15 (трехлетки 3+) особях – самцах амфибий вида *Rana*

*terrestris* Andrzejewski, 1832 (*Rana arvalis* Nilsson, 1842), 5 из которых служили контролем. Острое перегревание проводили в водной среде при температуре 32°C в течение 30 минут с дополнительной аэрацией. Забор материала осуществлялся через час после однократного острого перегревания. Для морфологических исследований образцы печени фиксировались в 10% забуференном нейтральном формалине и заливались в парафин. Для изучения гистотопографии органа срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином.

**Иммуногистохимическое** исследование осуществляли на парафиновых срезах печени стрептавидин-биотиновым методом с предварительной демаскировкой методом H1AR. После депарафинирования и дегидратации срезы инкубировали с первичными, далее с биотинилированными вторичными антителами (Link, DAKO LSAB+Kit Peroxidase). Промывали и инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Streptavidin, DAKO LSAB+Kit Peroxidase). В качестве субстрата пероксидазной реакции использовали раствор перекиси водорода. Пролиферативный гепатоцитов потенциал определяли антителами к PCNA гепатоцитов (разведение 1:100; DAKO); активированные клетки Ито – антителами к десмину (разведение 1:30; DAKO, DENMARK); активированные тканевые макрофаги – антителами к CD68 (разведение 1:25, ThermoScientific). Реализацию различных путей ПКГ гепатоцитов до и после воздействия гипертермии проводили, используя маркеры различных программ ПКГ: смерть клетки по типу I с помощью выявления антител к белкам-маркерам crrp-32 (разведение 1:100, Novocastra); смерть клетки по типу II – антителами к белку-маркеру начальной стадии аутофагии – LC3A/B (разведение 1:200, Abcam). Анализ путей регуляции танатогенных программ гибели клетки с помощью выявления антител к белкам-маркерам: p53 (разведение 1:80, Novocastra), bcl-2 (разведение 1:100, Novocastra) [Suvernev et al., 2011]. Подсчет числа цитотипов и пролиферирующих гепатоцитов проводился на площади в 0,04 мм<sup>2</sup>, в трех зонах ацинуса на световом микроскопе AxioImagerA1 с помощью программного обеспечения Axiovision rev. 4.7 («Carl Zeiss», Германия).

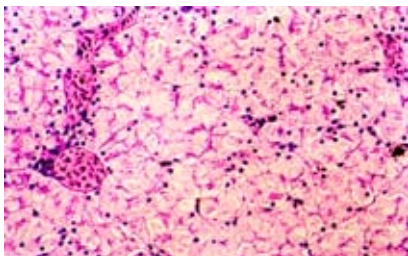
**Флуоресцентная микроскопия.** Тест «живое и мертвое» (life and dead assay) [Liu et al., 2000; Лямзаев, 2007] проводили путем прижизненного окрашивания гепатоцитов ядерными красителями Hoechst 33342 (Sigma, США; р-р в концентрации 20 мкг/мл на среде МЗ в течение 15 мин) и йодистым пропидием (Sigma, США; р-р в концентрации 20 мкг/мл на среде МЗ в течение 25 мин), для разделения гепатоцитов на группы, основываясь на критериях – состоянии плазматической мембраны и ядра с целью выявления апоптоз/некрозного соотношения гепатоцитов.

Использовался флуоресцентный микроскоп «Axioscope» («Carl Zeiss», Германия) с применением блока фильтров «Голубая» при длине волны  $\lambda$  500–550 и 600–700. Проводился подсчет фрагментированных ядер в расчете на 300 клеток.

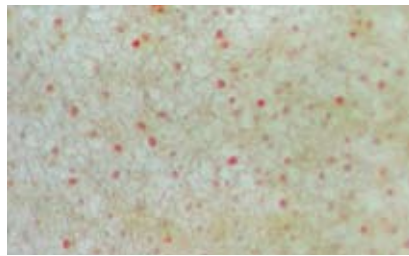
Статистическую обработку полученного материала осуществляли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA-6 ( $p = 0,05$ ) [Скибо, Абрамова, 2011].

**Обсуждение полученных данных.** Через час после однократного перегревания выявлены изменения в гистотопографии печени амфибий: паренхима в области центральных вен представлена обширными полнокровными синусоидными «протоками», проявляются признаки цитолиза гепатоцитов, нарушается цитоархитектоника ацинуса (рис. 1).

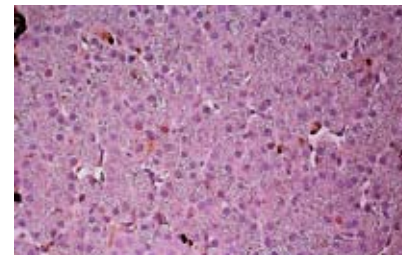
Отмечены изменения со стороны показателей паренхимных источников регенерации в сравнении с группой контроля: наблюдается уменьшение количества живых гепатоцитов на фоне увеличения количества двуядерных форм гепатоцитов, это, по всей видимости, является результатом ацитокинетических митозов, которые активировались за счет гепатоцитов, готовых к митозу и находящихся в фазе синтеза ДНК к моменту начала стрессирования. Тем самым увеличение количества PCNA-позитивных гепатоцитов (рис. 2) в центролобулярной зоне на фоне снижения числа живых гепатоцитов свидетельствует скорее о процессах репарации гепатоцитов, нежели об активации пролиферации. Так как, PCNA относится к группе факторов процессивности PCNA-зависимых ДНК-полимераз, которые участвуют в процессе репарации ДНК, потребность в PCNA, по всей видимости, возрастает под действием теплового стресса, отражая активацию как деструктивных так и репаративных



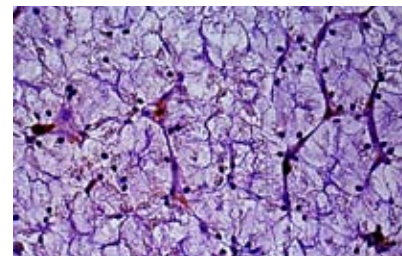
**Рисунок 1.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Окраска гематоксилин-эозин. Перегревание. Увеличение  $10 \times$  об20. Полнокровные синусоидные капилляры, цитолиз гепатоцитов.



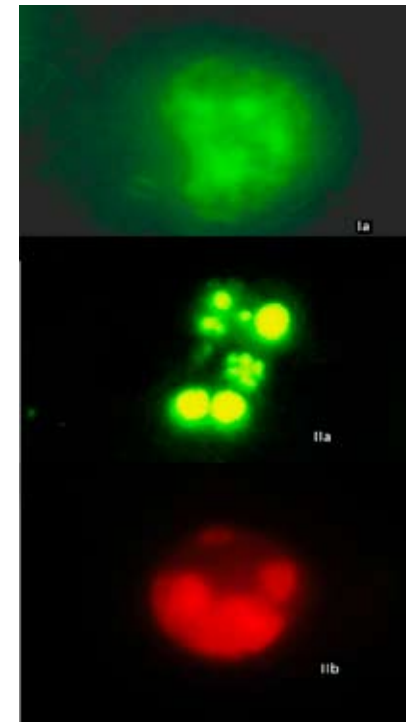
**Рисунок 2.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Перегревание. Увеличение  $10 \times$  об20. Окраска антителами к PCNA. Хромоген АЭК. Протокол HIAР (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB). Проллиферирующие гепатоциты.



**Рисунок 3.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Перегревание. Увеличение  $10 \times$  об20. Окраска антителами к p53. Хромоген АЭК. Протокол HIAР (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB). Центролобулярная зона.

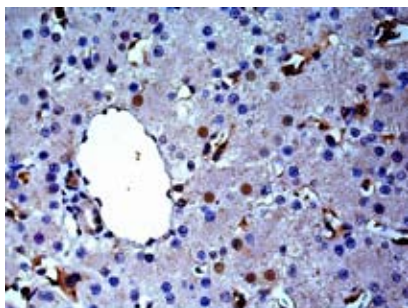


**Рисунок 4.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Перегревание. Увеличение  $10 \times$  об20. Окраска антителами к bcl-2. Хромоген АЭК. Протокол HIAР (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB). Центролобулярная зона.

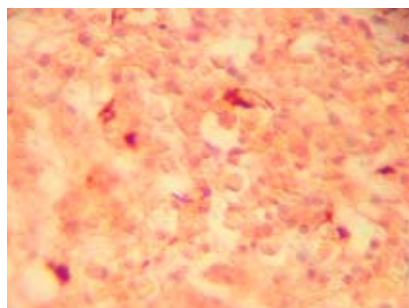


**Рисунок 5.** Гепатоциты амфибий вида *Rana terrestris*. Окраска (а) Hoechst 33342, (б) пропидиум йодид (PI). Перегревание. Увеличение  $10 \times$  об40. Пикноз и фрагментация ядра при апоптозе. Некроз – неупорядоченная фрагментация хроматина, нарушение целостности ядерной мембраны. I. Контроль. II. Перегревание.

процессов, связанных с повреждением ДНК и активацией ПКГ [Charles et al., 2005; Liu et al., 2000]. Активация процессов репарации ДНК подтверждается увеличением количества гепатоцитов экспрессирующих белок p53 (рис. 3). Тем не менее, выявляются гепатоциты с патологией ядра – пикноз, маргинальное расположение хроматина (рис. 5). Увеличение количества гепатоцитов, экспрессирующих белок p53 и уменьшение числа гепатоцитов экспрессирующих белок bcl-2 (рис. 4) в центролобулярной и перивенулярной зоне ацинуса, отражает реализацию программы гибели гепатоцитов по I типу – апоптоз (рис. 6) [Усов и др., 1968; Charles et al., 2005; Liu et al., 2000].



**Рисунок 6.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Перегревание. Увеличение ок10 х об40. Окраска антителами к сrr3. Хромоген АЭК. Протокол HIAР (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB). Область центральной вены.



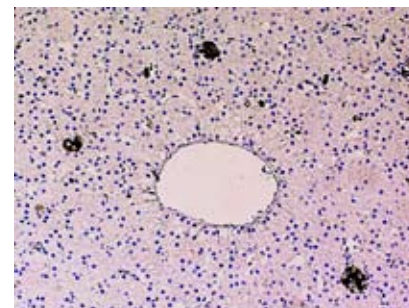
**Рисунок 7.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Перегревание. Увеличение ок10 х об40. Окраска антителами к десмину (десмин-позитивные клетки Ито - красного цвета). Протокол HIAР (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB), хромоген АЭК.

Таким образом, выявлены цитокоммуникативные взаимодействия цитотипов печеночного ацинуса, так в частности, в перипортальной зоне сопряжены показатели отражающие активацию ациитокинетических митозов гепатоцитами, тканевых макрофагов, трансформацию липидзапасующих в десминсинтезирующие клетки Ито (рис. 7), активацию обеих путей гибели гепатоцитов.

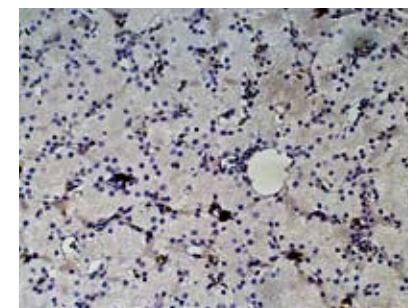
В центрлобулярной зоне отмечен самый широкий спектр сопряженностей – увеличение числа двуядерных и PCNA-позитивных гепатоцитов, тканевых макрофагов, трансформацию липидзапасующих в десминсинтезирующие клетки Ито. В данной зоне реализуются обе программы гибели гепатоцитов, но в большей мере аутофагии, за счёт уменьшения количества гепатоцитов, экспрессирующих белок bcl-2 – белка-онкогена, ингибитора апоптоза, и увеличения числа гепатоцитов экспрессирующих белок p-53. Это по всей видимости определяет переключение ПКГ с апоптоза на аутофагию.

В области центральных вен в большей мере прослеживаются деструктивные процессы – активация тканевых макрофагов, угнетение пролиферативного потенциала гепатоцитов, и так же как в центрлобулярной зоне, реализуются обе программы гибели гепатоцитов, но в большей мере аутофагии (рис. 8), за счёт уменьшения количества гепатоцитов, экспрессирующих белок bcl-2.

После гипертермии во всех зонах ацинуса отмечен высокий уровень активации тканевых макрофагов (клетки Купфера), что индуцировано увеличением количества погибших гепатоцитов во всех зонах печёноч-



**Рисунок 8.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Перегревание. Увеличение ок10 х об10. Окраска антителами к LC3A/B. Хромоген АЭК. Протокол HIAР (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB). Область центральной вены.



**Рисунок 9.** Печень амфибий вида *Rana terrestris*. Перегревание. Увеличение ок10 х об10. Окраска антителами к cd68. Хромоген АЭК. Протокол HIAР (Heat Induced Antigen Retrieval), стрептавидин-биотиновый метод (LSAB). Область центральной вены.

ного ацинуса [Чумаков, 2007; Самсонов, 2010] (рис. 9).

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: аутокринные и паракринные механизмы цитокоммуникативных индукций печени у амфибий вида *Rana terrestris* проявляются в изменении гистотопографии и морфологии гепатоцитов, активации во всех зонах ацинуса органоспецифических макрофагов, индуцирующих начальные звенья неспецифического иммунитета ранних этапов регенерации; в миофибробластической трансформации десминпозитивных клеток Ито; активации процессов пролиферации гепатоцитов в центрлобулярной зоне и ингибирование этого процесса в перивенулярной зоне, активации двух танатогенных программ гепатоцитов по пути аутофагии и апоптоза, в большей мере по пути аутофагии.

#### Список литературы

1. Антонова Е.И. Динамика показателей клеточного цикла гепатоцитов амфибий вида *Rana terrestris* индуцируемая тепловым стрессом как проявление первичной компенсаторно-приспособительной реакции организма // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2008. – №3. – С. 122–129.
2. Зданович В.В., Пушкарь В.Я. Температурная астатичность среды как экологический оптимум гидробионтов // Биологические науки Казахстана. – 2007. – № 4. – С. 68–78.
3. Лямзаев К.Г. Митохондрии при окислительном стрессе в культуре клеток HeLa: автореф. ... канд. биол. наук. МГУ. 03.00.04-биохимия. – Москва, 2007. – 25 с.
4. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиа Сфера, 2002. – С. 305.
5. Романова Е.Б. Иммунофизиологические механизмы поддержания гомеостаза организма в условиях воздействия стрессорных факторов среды обитания: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: специальность 03.00.13 – физиология. – Нижний Новгород, 2008. – 48 с.

6. Самсонов Л.В., Долотина Н.В., Логачева О.Н., Сазонов В.С. Поглощительная способность мононуклеарных фагоцитов печени в динамике после проведения общей гипертермии у экспериментальных животных // Труды II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вопросы патогенеза типовых патологических процессов». – Новосибирск, 2010. – С. 306–310.

7. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебно-методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза». – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.

8. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи совр. биол. – 2007. – Т. 47. – С. 3–52.

9. Charles N.D., Schmidt N., Schade M., Pauly B., Alexandrova O., Böttger A. Hydra and the evolution of apoptosis // Integr. Comp. Biol. – 2005. – Vol. 45. – P. 631–638.

10. Liu J.J., Peng L., Bradley C.J., Zulli A., Shen J., Buxton B.F. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts // Cardiovasc. Res. – 2000. – Vol. 45 (3). – P. 729–735.

11. Somero G.N. Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals: Optima, Limits, and Costs of Living Integrative and Comparative Text // Biology. – 2002. – Vol. 42. – № 4. – P. 780–789.

12. Suvernev A.V., Ivanov G.V., Novozhilov S.Yu., Yefremov A.V. Intensive Hyperthermia Therapy. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2011. – 95 p.

13. Zhu X., Wu L., Zhang L., Hao P., Zhang S., Huang J., Zheng J., Liu Y., Li W., Zhang Y., Zhou C., Zhang Y., Yin C.C., Qiu X. Distinct regulatory mechanism of immunoglobulin gene transcription in epithelial cancer cells // Cellular Molecular Immunology. – 2010. – Vol. 7. – P. 279–286.

## СЕКЦИЯ 2. БИОХИМИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

### ФЕНОЛГЛИКОЗИДЫ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ВОДОКРАСОВЫЕ (HYDROCHARITACEAE)

#### PHENOLIC GLYCOSIDES OF SOME SPECIES OF HYDROCHARITACEAE FAMILY

Е.А. Алехина<sup>1</sup>, А.Н. Ефремов<sup>1</sup>, А.Е. Егошина<sup>2</sup>

Е.А. Alekhina<sup>1</sup>, А.Н. Efremov<sup>1</sup>, А.Е. Egoshina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Омский государственный педагогический университет,  
Российская Федерация, Омск

Omsk State Pedagogical University, Russian Federation, Omsk

<sup>2</sup>Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского,  
Российская Федерация, Омск

Omsk State University named after F.M. Dostoevsky, Russian Federation, Omsk  
E-mail: chemconf@mail.ru

**Summary.** The results of the study of phenolic glycosides of some species of Hydrocharitaceae family are presented. The content of arbutin in *Elodea canadensis* ( $1.7 \pm 0.7\%$ ) and *Stratiotes aloides* ( $2.5 \pm 1.8\%$ ) is comparable to traditional natural sources of *Orthilia secunda*. *Hydrocharis morsus-ranae* differs minimally from content of arbutin.

В последнее время повышается интерес к препаратам растительного происхождения. Терапевтическая ценность лекарственных растений определяется входящими в их состав биологическими активными веществами, среди которых известны фенольные соединения, к которым и относят фенолгликозиды [Гришина и др., 2002; Крепкова, 2011]. Фенолгликозиды – это гликозиды простых фенолов, которые при гидролизе расщепляются на агликаны, содержащие одну или несколько гидроксильных фенольных групп при одном бензольном кольце. Фенольные гликозиды достаточно широко распространены в растениях различных семейств [Кретович, 1980; Ладыгина, Сафронич, 1983]. Наиболее ярким представителем фенолгликозидов является арбутин, который и был определен в рамках настоящей работы объектом исследования.

Представители семейства Hydrocharitaceae широко распространены в водных объектах Западно-Сибирской равнины. Некоторые из них, элодея канадская (*Elodea canadensis* Michx.), телорез алоэвидный (*Stratiotes aloides* L.), водокрас лягушачий (*Hydrocharis morsus-ranae* L.) нередко образуют значительные по площади сообщества и формируют большую биомассу. При этом данная группа остается еще плоха изученной в фитохимическом плане.

**Материалы и методы исследования.** Фенольные гликозиды, имеющие свободную гидроксильную группу, дают все реакции, характерные для фенолов [Ладыгина, Сафронич, 1983]. Отбор проб побегов исследованных растений выполнен в долине р. Иртыш (Омская область, Любинский район) в период цветения (июль 2013 г.). Пробоподготовка исследованных образцов включала высушивание до воздушно-сухой массы и измельчение. Качественное определение фенолгликозидов (арбутина) проводили при помощи тонкослойной хроматографии и качественных реакций [Ладыгина, Сафронич, 1983]. Количественное определение фенолгликозидов проводили двумя методами: титриметрии и фотометрии. Первый метод состоял в йодометрическом титровании гидрохинона, полученного после извлечения и гидролиза арбутина [Ладыгина, Сафронич, 1983] (рис. 1).

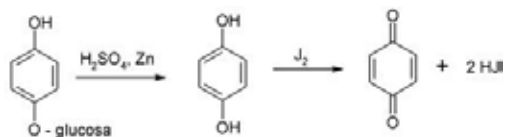


Рисунок 1. Схема реакции получения гидрохинона и его реакции с йодом

Второй метод определения фенолгликозидов основан на взаимодействии арбутина с диазотированным сульфанилом (рис. 2) и измерении оптической плотности полученного раствора [Патент РФ..., 2006]. Измерение оптической плотности выполнено на фотоколориметре КФК-2.

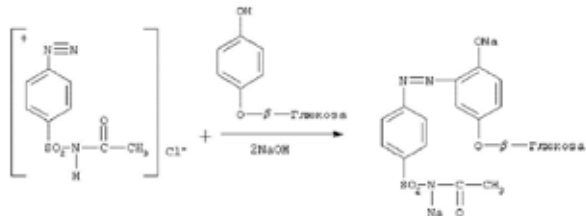


Рисунок 2. Схема реакции диазотированного сульфанила с арбутином

**Результаты исследования и их обсуждение.** Результаты качественных реакций на фенолгликозиды (арбутин) растений семейства Hydrocharitaceae представлены в табл. 1. Проведенные испытания с *Elodea canadensis*, *Stratiotes aloides* и *Hydrocharis morsus-ranae* дали положительные результаты на содержание фенолгликозидов, за исключением реакции с сульфатом железа (II) (табл. 1).

Результаты количественного определения арбутина титриметрическим методом показали сходные результаты у обоих исследуемых видов (табл. 2).

Результаты фотометрического определения арбутина [Патент РФ..., 2006] представлены в табл. 3.

Таблица 1  
Результаты качественного определения содержания фенолгликозидов

Реагент	Признак реакции	
	Экспериментальный	Теоретический
Сульфат железа (II)	–	Темно-фиолетовый цвет
10 %-ный р-р фосфорномолибденово-кислого натрия в 10 %-м р-ре HCl	Красное окрашивание	Синее окрашивание
Реактив Паули	Желто-оранжевое окрашивание	Желто-оранжевое окрашивание
Тонкослойная хроматография	Ярко-красные и фиолетовые пятна	Ярко-красные пятна

Таблица 2  
Результаты определения содержания арбутина методом титриметрии (воздушно-сухое вещество)

Объект	<i>Elodea canadensis</i> (n=3)	<i>Stratiotes aloides</i> (n=3)
Массовая доля арбутина, %	1,6 ± 0,7	1,7 ± 1,4

Таблица 3  
Результаты определения содержания арбутина методом фотометрии (воздушно-сухое вещество)

Объект	<i>Elodea canadensis</i> (n=3)	<i>Stratiotes aloides</i> (n=3)	<i>Hydrocharis morsus-ranae</i> (n=3)	<i>Orthilia secunda</i> (n=3)
Массовая доля арбутина, %	1,7 ± 0,7	2,5 ± 1,8	0,07 ± 0,06	3,20 ± 0,07

Таким образом, содержание арбутина у *Elodea canadensis* и *Stratiotes aloides* сопоставимо с ортилией однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) – традиционным источником арбутина. *Hydrocharis morsus-ranae*, в отличие от остальных изученных представителей Hydrocharitaceae, отличается наименьшим содержанием арбутина в воздушно-сухом веществе. Это указывают на возможности их использования Hydrocharitaceae как природного источника арбутина.

#### Список литературы

1. Гришина Е.И., Погодин И.С., Лукша Е.А. Фармакогнозия. – Омск: ОмГМА, 2002. – 1067 с.
2. Крепкова Л.П. Современные подходы к доклинической оценке безопасности лекарственных средств растительного происхождения // Биомедицина. – 2011. – № 4. – С. 150.
3. Кретович В.Л. Биохимия растений. – М.: Высшая школа, 1980. – 448 с.
4. Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отряшенкова В.Э. и др. Химический анализ лекарственных растений. – М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
5. Патент РФ № RU 2 327 145 C2, МПК G01N21//00 от 06.04.2006, Федосеева Г.М., Минович В.М., Кахерская Ю.С., Лаврушина Д.А. Способ количественного определения арбутина в растениях семейства Грушанковые.

*Omsk State Pedagogical University, Biology Department,  
Russian Federation, Omsk*

<sup>3</sup> *Омская медицинская государственная академия, кафедра биохимии,  
Российская Федерация, Омск  
Omsk State Medical Academy, Biochemistry Department,  
Russian Federation, Omsk*

**Summary.** Revealed changes in the activity of enzymes of energetic and plastic metabolism after exposure of hyperthermia solve two problems. The adaptation of metabolism to hypoxia due to the development of metabolic depression in birds as a protection against oxidative stress during reoxygenation period in order to maintain homeostasis according to the principle of minimum energy expenditure. In Reptilia a number of processes that are not functioning or poorly functioning normally are launched.

Гипертермия нашла широкое применение в качестве лечебного метода различных инфекционных, воспалительных и онкологических заболеваний, для сенсбилизации клеток к радиационному и химическому воздействиям при терапии опухолей [Зеленина и др., 2000; Тонов и др., 2002]. В тоже время сохранение гомеостаза организма в условиях воздействия экстремальной экзогенной гипертермии во многом достигается за счет модификации активности ферментов энергетического и пластического обмена, происходящей вследствие изменения их каталитических свойств, концентрации субстратов и молекул-регуляторов на фоне изменения проницаемости клеточных мембран, от суммарного эффекта нейрогуморальных регуляторных систем организма, фонда метаболитов и кофакторов, специфичных для каждого фермента и его генетически запрограммированной «нормы реакции» [Jayatri, 2006; Brandt, 2006; Muleme et al., 2006]. Эволюция, дифференцировка и морфология клеток зависела в значительной степени от экологических условий и среды обитания [Little, 2005], а увеличение концентрации кислорода обеспечило поддержание высокой метаболической активности, в свою очередь ксенобиотики стали важным фактором в формировании разнообразия физиологии многоклеточных животных [Nelson et al., 2003]. Известно, что эктотермные животные могут испытать часовые, циркадные и сезонные температурные перепады [Angilletta et al., 2003; Litzgus, Hopkins, 2003]. Тогда как эндотермные организмы испытывают более узкий диапазон температурного колебания [Angilletta, 2004]. Адаптация метаболизма к изменениям температуры у экто- и эндотермных животных обеспе-

### ПРОЯВЛЕНИЯ РАННЕГО ЭТАПА РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ В СРАВНИТЕЛЬНОМ ЭВОЛЮЦИОННОМ РЯДУ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

#### DEVELOPMENT OF THE EARLY STAGE OF REPARATIVE REGENERATION AT THE MOLECULAR LEVEL IN A COMPARATIVE EVOLUTIONARY SERIES OF VERTEBRATES

**Е.И. Антонова<sup>1</sup>, О.З. Мкртчян<sup>2</sup>, В.Е. Высокогорский<sup>3</sup>  
E.I. Antonova<sup>1</sup>, O.Z. Mkrtchan<sup>2</sup>, V.E. Vysokogorsky<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии Ульяновского государственного педагогического университета имени И.Н. Ульянова*

*Research Center of Fundamental and Applied Problems of Bioecology  
and Biotechnology of the Ulyanovsk State Pedagogical University  
named after I.N. Ulyanov  
E-mail: antonovaeil@rambler.ru*

<sup>2</sup> *Омский государственный педагогический университет, кафедра биологии,  
Российская Федерация, Омск*

чивается, в первую очередь, переключением метаболических путей с толерантной на резистентную или наоборот [Hofmann, 2005].

В связи с этим **целью** нашего исследования является изучить степень компенсации интенсивности метаболизма у экто- и эндотермных животных после воздействия гипертермии.

**Методы исследования.** Печень перфузировали холодным 0,9% NaCl, гомогенизировали на льду. Митохондриальную и цитозольную фракции в обеих моделях получали методом дифференциального центрифугирования.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на СФ-26 при  $\lambda=340$  нм. Активность оксидоредуктаз (ИДГ-НАД – КФ 1.1.1.41; ИДГ-НАДФ – КФ 1.1.1.42; МДГ-НАД – КФ 1.1.1.37; МДГ-НАДФ – КФ 1.1.1.40 и ЛДГ – КФ 1.1.1.27) регистрировали по изменению оптической плотности при изменении концентрации восстановленных форм НАД и НАДФ в нмоль субстрата/мин на мг белка [Методы биохимических исследований, 1982; Медведев, 1994]. Активность ЛДГ определяли в гомогенате печени регистрируя оптическую плотность концентрации НАДН в ходе катализируемого ферментом превращения пирувата в лактат [Gibb, Dickson, 2002; Neyginck et al., 2005]. Активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ – КФ 1.1.1.49) выражали в нмоль НАДФН•Н<sup>+</sup>/мин•мг белка [Методы биохимических исследований, 1982].

Активность каспазы-3 (CPP-32) определяли с помощью коммерческого набора «Caspase-3 Assay Kit» (Sigma, США) на многоканальном спектрофотометре Platr Reader Star-30 (Kenstar, США) в мкм/мг белка по инструкции производителя. Свободную активность кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2) определяли спектрофотометрически в цитозольной фракции по скорости гидролиза п-нитрофенилфосфата/г/мин (Merck, Германия) при  $\lambda=515$  нм и выражали в нмоль конечного продукта, полученного за 1 мин/мг белка [Maciejewski et al., 2001]. Содержание ионов определяли ионоселективным методом в цитозольной фракции с помощью анализатора EasyLyte Calcium (Medica, США), предназначенного для измерения ионизированного [Ca<sup>2+</sup>], [K<sup>+</sup>], [Na<sup>+</sup>], на 100 мкл субстрата, выражали в мэкв/л. Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури.

**Статистические методы.** Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA-5. Различия считались значимыми при  $p=0,05$ .

**Модель эксперимента.** Гипертермия у изучаемых видов животных: эктотермные (песмыкающиеся, рептилии – вид *Pseudemys (Chrysemys*

*scripta* var. *elegans* 1889, *Trachemys scripta elegans*) красноухие половозрелые черепахи самцы (пять лет развития); эндотермные – птицы – вид *Columba livia* (forma *domestica*) Gmelin, 1789, половозрелые сизые голуби самцы (6 месяцев развития) достигалась путем пребывания эндотермных животных в течение 30 минут в воздуховентилируемой камере «Chirana» при температуре 42°C. Для эктотермных животных перегревание проводили в течение 30 минут в водной среде (42°C) в условиях свободного плавания с дополнительной аэрацией. Эксперимент поставлен на 50 особях животных (25 служили контролем). Температурное воздействие в заданном режиме приводило к развитию теплового удара средней тяжести [Somero, 2002; McKechnie, Wolf, 2004; Chang, Lucy Hou, 2005]. При проведении эксперимента руководствовались принципами гуманного отношения к животным (Рекомендации Международного комитета по науке 1978 г., конвенции Совета Европы 1986 г. по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

**Полученные результаты и их обсуждение.** Через час после воздействия гипертермии нами выявлено – увеличение активности ИДГ(НАД) митохондрий в 1,8 раза у рептилий, отражая процесс интенсификации процессов катаболизма субстратов в ЦТК и, как следствие, увеличение генерации восстановленных эквивалентов для дыхательной цепи митохондрий. У птиц, наоборот активность фермента на 36% угнетается (рис. 1–4), отражая угнетение процессов связанных с синтезом митохондриального АТФ, катаболизма  $\beta$ -окисления жирных кислот [Hochachka, Lutz, 2001].

Самое выраженное угнетение проявляется в активности ИДГ(НАДФ) митохондрий у рептилий – 89%.

Увеличивается на 15% активность МДГ(НАД) и на 50% МДГ(НАДФ) митохондрий у рептилий. В группе птиц проявляется прямо противоположная реакция – активность НАД-зависимого фермента снижается на 18% и НАДФ-зависимой МДГ митохондрий на 40%. Выявленное увеличение активности МДГ(НАДФ) митохондрий у рептилий по всей видимости определяется увеличением поступления оксалоацетата в цитоплазму, где он может участвовать в активации начальных звеньев глюконеогенеза, активации малат-аспартатного шунта а восстановленные эквиваленты в биосинтетических процессах, в том числе для синтеза жирных кислот.

Активность НАД-зависимой ИДГ цитозоля снижается у рептилий на 18% и НАДФ-зависимой МДГ – на 43%. Следовательно, снижается количество восстановленного малата для митохондрий, а также восста-

новленных эквивалентов для биосинтетических процессов и детоксикации в цитозоле гепатоцитов. Снижение, таким образом, продукции восстановленных эквивалентов в цитозоле после гипертермии отражает развитие гипоксии указывает снижение продукции восстановленных эквивалентов, так как способность акцептировать атомы водорода зависит от уровня окисляемости субстрата. В связи с этим инициируется анаэробный путь расщепления глюкозы для дополнительного обеспечения гепатоцитов энергией, предупреждая развитие гипохромированного состояния. В связи с этим отмечается увеличение активности ЛДГ у рептилий и птиц на 66% и 23% соответственно (рис. 1–4). Увеличение активности ЛДГ отражает состояние развивающейся гипоксии, активацию анаэробного пути окисления глюкозы с образованием лактата а не пирувата, в связи с чем снижается количество субстрата для цитратного цикла и как следствие снижается активность ферментов цикла Кребса у птиц, в цитозоле ингибируется процесс гликогенолиза на фоне активации процесса анаэробного окисления глюкозы и мобилизации гликогена. ЛДГ самый распространенный и древний фермент среди организмов животного мира. В связи с этим его роль в энергообеспечении гепатоцитов играет определяющую роль в специфическом функционировании и выживаемости в норме и в условиях стресса.

Таким образом, снижение продукции митохондриального АТФ у птиц носит защитный характер так как обеспечивает снижение потребления АТФ и выживаемость гепатоцитов в ранней период компенсации после воздействия гипертермии, снижение же активности ЦТК определяет угнетение активности дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, а, соответственно, и продукцию АФК, минимизируя таким образом эффект повреждающего их действие на белки и ДНК гепатоцитов.

В связи с этим выявлены отличия в соотношениях между активностью митохондриальных дегидрогеназ и уровнем активности ЛДГ. Так в группе рептилий соотношение снижается с 0,57 в контроле, до 0,27 после гипертермии. Соответственно у интактных животных доля активности ферментов митохондрий составляет 36%, ЛДГ 64%, а после перегревания 21% и 77% соответственно. В группе птиц соотношение с 0,75 снижается до 0,45. Так же, как у эктоtherмных животных, у птиц выявлено преобладание в условиях нормы активности ЛДГ (57%) над активностью дегидрогеназ ЦТК (43%). После перегревания отмечается та же тенденция, как и в группе рептилий – снижается активность ферментов ЦТК (31%) и увеличивается активность ЛДГ (69%).

Известно, деятельность ферментов ЛДГ и МДГ обеспечивает поддержание баланса окислительно-восстановительного потенциала в течение

анаэробного гликолиза [Washizu et al., 2005]. Повышение устойчивости организма к кислородному голоданию сопровождается по всей видимости усилением синтеза Н-субъединиц ЛДГ, осуществляющих утилизацию лактата в тканях, анаэробный путь энергетического обмена в тканях в условиях стресса активирует адреналин, определяя увеличение потребления гепатоцитами АТФ опосредуя развитие гипохромированного состояния и модуляцию путей ПКГ [Busk, Boutilier, 2005]. Активация гликолиза по всей видимости может быть следствием активации утилизации гликогена, т.к. известно, что промежуточный продукт расщепления гликогенолиза – глюкозо-6-фосфат, может использоваться как в ПФП, так и в ходе гликолиза

После гипертермии активность Г-6-ФДГ цитозоля у рептилий, соответствует контрольным показателям. Тогда как у птиц активность фермента увеличивается в два раза. За счет увеличения активности Г-6-ФДГ в цитозольной фракции гепатоцитов птиц увеличивается продукция восстановленных НАДФН, которые играют ключевую роль в регуляции и функционировании ГР/ГП АОС, детоксикации ксенобиотиков, отражая развёртывание процессов регенерации, активации анаболических, пролиферативных и репаративных процессов в гепатоцитах, редокс-циклирования глутатиона в условиях активации процессов перекисидации, биосинтеза жирных кислот, эффективного ингибирования активности каталазы обеспечивая функционирование монооксигеназной системы детоксикации ксенобиотиков и сдерживания развития оксидативного стресса [Filosa et al., 2003; Baker, 2005; Gaetani et al., 2005; Tozzi et al., 2006]. Промежуточные продукты окислительного этапа ГМП создают возможность переключения потока метаболитов с ГМП на анаэробный путь окисления глюкозы [Gao et al., 2004; Gilman et al., 2006]. А активация синтеза жирных кислот опосредовано исключительно НАДФН, восстановленных в ходе ГМП пути. Продукты ГМП включаются в гликолиз, затем в цитратный цикл, обеспечивая функционирование ЦТК. Выявленная активация Г-6-ФДГ, в период включения кислорода при реоксигенации определяет перикислородонасыщения гепатоцитов после гипоксии у птиц. У черепах активность фермента, которая соответствует контрольным значениям, по всей видимости, отражая более высокую устойчивость процессов АОС к действию гипертермии. Сформированные адаптации к естественной гипоксии у рептилий закреплены на уровне структурно-функциональной организации кровеносной системы. В связи с этим в группе рептилий, в большей мере проявляется активность ферментов ЦТК [Willmore, Storey, 2005]. В свою очередь восстановленный глутатион необходим для поддержания конформации клеточных белков.

Г-6-ФДГ в условиях нарушения окислительно-восстановительного статуса гепатоцитов увеличивается содержание специфических мРНК и индукция синтеза Г-6-ФДГ [Gao et al., 2004].

При развитии «гипоксического стресса» увеличивается количество перекиси водорода и образование «эндогенного кислорода», который поступает в цепь энергетического метаболизма и, по всей видимости, является дополнительным фактором обеспечения более эффективного использования ограниченного резерва кислорода в организме [Константинов и др., 2004]. В то же время анаэробный метаболизм используется животными не для того, чтобы восполнить энергетический дефицит и сохранить продукцию АТФ на предсуществующем уровне, а для поддержания нового устойчивого гипометаболического состояния. У птиц мембраны более проницаемы для ионов, чем у эктотермных животных, поэтому для поддержания трансмембранного ионного градиента требуется гораздо больше энергии. Даже при условии выраженной метаболической депрессии других энергозатратных процессов данные функции в клетках птиц не могут длительное время осуществляться за счет гликолиза [St-Pierre et al., 2000].

После гипертермии активируются ферменты, которые отражают развертывание программ ПКГ гепатоцитов. Так, у интактных животных активность ферментов у рептилий увеличивается: свободная активность кислой фосфатазы более, чем в два, а каспазы3 в три раза. Причем в контроле разница в активности ферментов составляет 33%, за счет более высокой активности свободной кислой фосфатазы. После перегревания эта разница сокращается до 21%, уже за счет большей активации каспазы3, тем не менее, так же, как и в контроле, уровень свободной активности кислой фосфатазы остается выше. У птиц уровень свободной активности кислой фосфатазы после перегревания не меняется, а активность каспазы3 увеличивается в 1,8 раза в сравнении с контролем. У интактных животных активность каспазы3 к активности свободной активности кислой фосфатазы составляет 86%, после перегревания увеличивается до 91%. Гипоксия, развивающаяся в условиях гипертермии, в свою очередь, вызывает повышение проницаемости мембран гепатоцитов, ведет к активации лизосомальных гидролаз и включению ацидозного и лизосомного механизмов повреждения клетки – некроз и аутофагия.

Гипертермия определяет денатурацию белка в связи с чем, аутофагия дефектных белков будет проявляться весьма активно, что в свою очередь влечет за собой неизбежную трату энергии. Активаторами ферментов лизосом являются так же ПОЛ, наличие разрушенных митохондрий [Mizushima, 2004; Levine, Klionsky, 2004; Yang et al., 2005; Codogno, 2005;

Kelekar, 2006]. Кислые фосфатазы, которые широкого спектра действия, участвующие в углеводном, липидном, нуклеотидном обменах, поэтому изменение их активности может служить показателем любого из этих звеньев метаболизма. Кроме того увеличение активности кислой фосфатазы может быть следствием активации синтетических и регенераторных процессов в печени, инактивации гепатотоксинов, инициации ПКГ. Гены и молекулярные механизмы метаболических путей аутофагии выявлены и являются эволюционно-консервативными [Mariño G., López-Otin, 2004]. При образовании аутофагосом экспрессируются специфические белки, протеазы, в том числе каспаза3, активность которой повышалась в обеих группах и стала почти синонимом клеточной гибели [Li, Jackson, 2002]. Активация каспазы3 определяет реорганизацию цитоскелета, инактивацию ферментов репарации ДНК, регуляторов клеточного цикла, протеинкиназ, специфического ингибитора CAD [Kivinen et al., 2005], вызывая, конденсацию и фрагментацию хроматина гепатоцитов, блеббинг и формирование апоптозных.

Прелетальным и летальным изменениям в клетках в результате целого ряда неблагоприятных воздействий всегда предшествует повышение содержания в цитозоле ионов  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 1–4). Так, у обоих видов животных выявлено многократное увеличение ионов  $[Ca^{2+}]_i$  в цитозоле гепатоцитов. Наряду с увеличением содержания  $[Ca^{2+}]_i$  у рептилий на 30,4% уменьшается концентрация ионов  $[K^+]_i$ . В связи с этим можно говорить о нарушении функционирования  $Ca^{2+}$ -АТФазы митохондрий и ионных каналов ЭПС, депонирование ионов кальция, активации ПКГ, увеличения проницаемости мембран гепатоцитов, в частности митохондриальных, с дальнейшим увеличением трансмембранного потенциала, это служит причиной увеличения скорости образования АФК комплексом III дыхательной цепи. Как следствие, фрагментация (или набухание) митохондрий. Нарушение целостности мембран митохондрий определяет выход цитохрома *c* из межмембранного пространства, что является одним из путей активации гибели гепатоцитов как по пути апоптоза, так и по пути программированного некроза. В тоже время  $Ca^{2+}$ -регулируемые процессы обеспечивают удаления апоптических клеток и клеточного дебриса с помощью тканевых макрофагов [Scholz, 2002].

Учитывая, что большинство животных в течение своей жизни в той или иной степени подвергаются гипоксии в результате внешнего воздействия или через развитие метаболической, дыхательной и циркуляторной недостаточности. Соответственно существуют две разные адаптационные стратегии переживания неблагоприятных условий: толерантная и резистентная [Кулинский, Ольховский, 1992]. Резистентная стратегия



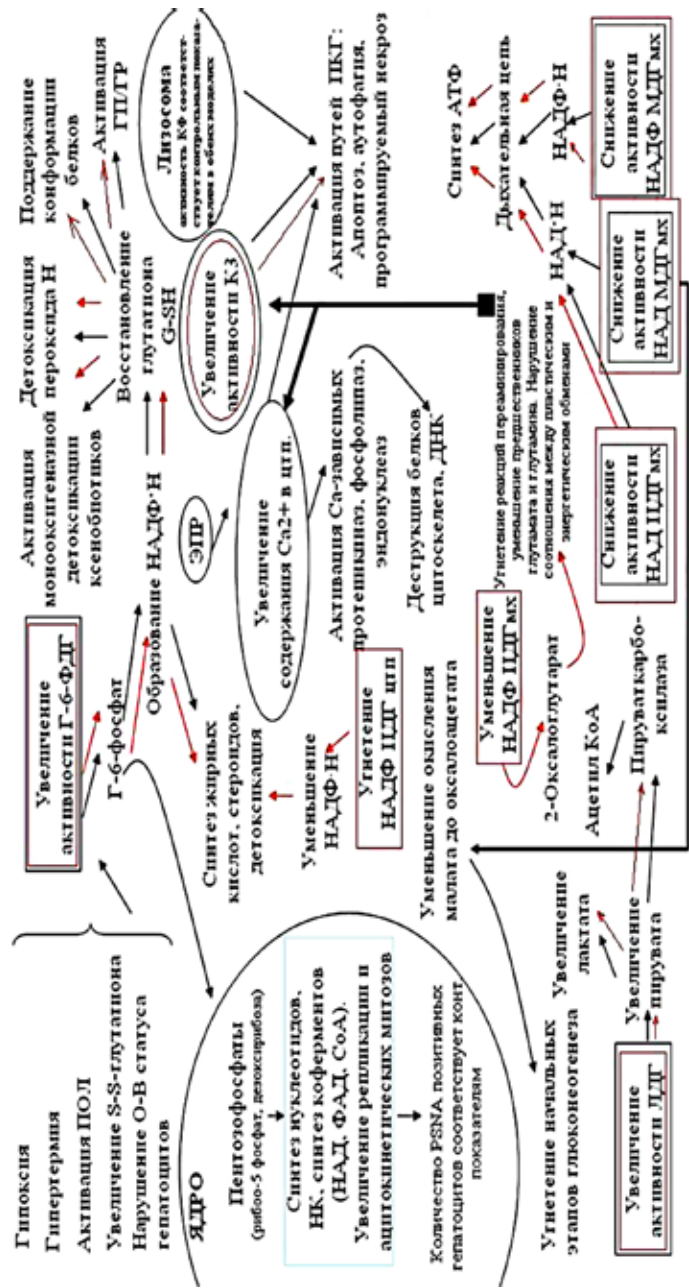


Рисунок 4. Метаболическая карта компенсаторно-приспособительной реакции гепатоцитов *Columba livia* в модели in vivo (черный цвет) и in vitro (красный цвет).

Филогенетически более древняя – толерантная (гипометаболическая, толерантный гипобиоз) стратегия, характеризуется подчинением условиям внешней среды, минимизацией функций. В наших экспериментах после гипертермии в группе птиц наблюдается переключение резистентной стратегии метаболизма на толерантную [Sabat et al., 2006]. Метаболической основой такой стратегии является уменьшение катаболизма, энергозатрат и потребления кислорода [Кулинский, Ольховский, 1992; Makarieva et al., 2006]. Метаболическая депрессия у эктотермных животных, как известно, может иметь естественную физиологию, когда гипоксическое состояние сменяется гипероксическим вследствие реоксигенации [Pritchard, 2002]. В этих условиях основным источником энергии является катаболизм липидов [Hermes-Lima, Zenteno-Savin, 2002; Jackson, 2004]. Но, как показал наш эксперимент, толерантная стратегия типична не только для эктотермных животных, она достаточно широко распространена у эндотермных как эволюционно закрепленная адаптация. Отражая положение о том, что новые возможности (функции) в эволюции возникают на базе уже достигнутого. Через эту уникальную способность – снижать энергетическую потребность АТФ-зависимых процессов – обеспечивается поддержание целостности гепатоцитов и его структур [Flanigan, Guppy, 2004]. Также, по всей видимости, имеет место активация ферментов, которые функционируют в летний период и являются критическими для выживания в течение метаболической депрессии [Willmore, Storey, 2005]. Дополнительно выявленную активацию метаболизма у рептилий можно объяснить тем, что они являются потомками древних амфибий, которые дали начало двум крупнейшим линиям современных высших позвоночных – птицы и млекопитающие. Черепахи стоят особняком от всех рептилий, они единственные могут рассматриваться относительно прямыми потомками котилозавров и, следовательно, являются наиболее близко стоящими к рептилиеподобным предкам млекопитающих. Таким образом, можно предположить, что при экстремальных состояниях у эндотермов могут активизироваться пойкилотермные механизмы терморегуляции и наоборот.

#### Список литературы

1. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. – Челябинск, 2000. – 167 с.
2. Зеленина Н.В., Андреева Л.И., Горянчук В.В. Действие непродолжительного умеренного нагревания организма здорового человека на периферические лимфоциты // Цитология. – 2000. – Т. 42 (2). – С. 166–169.
3. Константинов А.С., Пушкарь В.Я., Зданович В.В., Аверьянова О.В., Речинский В.В.

Энергобюджет молодых осетровых в постоянном, переменном терморегиме и при свободном плавании в термоградиентном пространстве // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2004. – № 1. – С. 38–43.

4. Кулинский В.И., Ольховский И.А. Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях – резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов // Успехи современной биологии. – 1992. – № 6. – С. 697–714.

5. Медведев А.Е. Исследование регуляторных и каталитических свойств митохондриальных моноаминоксидаз и структуры их эндогенного ингибирования трабулином: автореф. дис. ... докт. мед. наук. – М., 1994. – 43 с.

6. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. – Ленинград: Университет, 1982. – 380 с.

7. Тронов В.А., Константинов Е.М., Крамаренко И.И. Сигнал к апоптозу, индуцированный гипертермией, и пути его передачи в клетке // Цитология. – 2002. – Т. 44. – №11. – С. 48–52.

8. Angilletta M.J. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle // Integrative and Comparative Biology. – 2004. – Vol. 44 (6). – P. 498–509.

9. Angilletta M.J., Wilson R.S., Navas C.A., James R.S. Tradeoffs and the evolution of thermal reaction norms // Trends Ecol. Evol. – 2003. – Vol. 18. – P. 234–240.

10. Baker M.E. Xenobiotics and the evolution of multicellular animals: emergence and diversification of ligand-activated transcription factors // Integrative and Comparative Biology. – 2005. – Vol. 45 (1). – P. 172–178.

11. Brandt U. Energy converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I) // Annual Review of Biochemistry. – 2006. – Vol. 75. – P. 69–92.

12. Busk M., Boutilier R.G. Metabolic arrest and its regulation in anoxic eel hepatocytes // Physiological and Biochemical Zoology. – 2005. – Vol. 78 (6). – P. 926–936.

13. Chang Y.-M., Lucy Hou P.-C. Thermal acclimation of metabolic rate may be seasonally dependent in the subtropical anuran *Rana latouchii* (Boulenger) // Physiological and Biochemical Zoology. – 2005. – Vol. 78 (6). – P. 947–955.

14. Codogno P. Autophagy in a surviving of an alveole and mors // Journal Soc. Biol. – 2005. – Vol. 199 (3). – P. 233–241.

15. Filosa S., Fico A., Pagliarunga F., Balestrieri M., Crooke A., Verde P., Abrescia P., Bautista J.M., Martini G. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress // Biochem J. – 2003. – Vol. 370 (3). – P. 935–943.

16. Flanigan J.E., Guppy M. Metabolic depression and sodium-potassium ATPase in the aestivating frog, *Neobatrachus kunapalari* // Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. – 2004. – Vol. 167 (2). – P. 135–145.

17. Gaetani G.F., Ferraris A.M., Sanna P., Kirkman H.N. A novel NADPH:(bound) NADP<sup>+</sup> reductase and NADH:(bound) NADP<sup>+</sup> transhydrogenase function in bovine liver catalase // Biochem. J. – 2005. – Vol. 385. – P. 763–768.

18. Gao L., Mejias R., Echevarria M., Lopez-Barneo J. Induction of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression by chronic hypoxia in PC12 cells // FEBS Letters. – 2004. – Vol. 569. – Is. 1–3. – P. 256–260.

19. Gibb A.C., Dickson K.A. Functional morphology and biochemical indices of performance: is there a correlation between metabolic enzyme activity and swimming performance? // Integrative and Comparative Biology. – 2002. – Vol. 42 (2). – P. 199–207.

20. Gilman S.E., Wetthey D.S., Helmut B. Variation in the sensitivity of organismal body temperature to climate change over local and geographic scales // PNAS. – 2006. – Vol. 103 (25). – P. 9560–9565.

21. Hermes-Lima M., Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress // Comp Biochem Physiol C. – 2002. – Vol. 133. – P. 537–556.

22. Hochachka P.W., Lutz P.L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals // Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. – 2001. – Vol. 130. – Is. 4. – P. 435–459.

23. Hofmann G.E. Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales // Integr. Comp. Biol. – 2005. – Vol. 45 (2). – P. 247–255.

24. Jackson D.C. Acid-base balance during hypoxic hypometabolism: selected vertebrate strategies // Resp. Phys. Neuro. – 2004. – Vol. 141. – P. 273–283.

25. Jayatri D. The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation // BioEssays. – 2006. – Vol. 28. – Is. 9. – P. 890–901.

26. Kelekar A. Autophagy // Ann. N.Y. Acad. Sciences. – 2006. – Vol. 1066. – P. 259–271.

27. Kivinen K., Kallajoki M., Taimen P. Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix // Exp. Cell Res. – 2005. – Vol. 311(1). – P. 62–73.

28. Levine B., Klionsky D.J. Development by self-boiling down: molecular mechanisms and biological functions autophagy // Alveole Dev. – 2004. – Vol. 6 (4). – P. 463–477.

29. Li C.Y., Jackson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // Am. J. Physiol. – 2002. – Vol. 282. – P. 227–241.

30. Little P.F. Structure and function of the human genome // Genome Res. – 2005. – Vol. 15 (12). – P. 1759–1766.

31. Litzgus J.D., Hopkins W.A. Effect of temperature on metabolic rate of the mud turtle (*Kinosternon subrubrum*) // Journal of Thermal Biology. – 2003. – Vol. 28. – Is. 8. – P. 595–600.

32. Maciejewski R., Kopieniak M., Madej B., Sek A., Dabrowski A. Acid phosphatase activity in different organs as a marker of acute pancreatitis // Ann. UMCS. D. – 2001. – Vol. 56. – P. 357–361.

33. Makarieva A., Gorshkov V., Lià I.-L., Chown S.L. Dimensions Blackwell Publishing Ltd - and temperature independence of the minimal metabolic norms bolstering life [discharges] // Functional Ecology. – 2006. – № 20. – P. 83–96.

34. Mariño G., López-Otin C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in a human pathology // Cell Mol. Life Sci. – 2004. – Vol. 61 (12). – P. 1439–1454.

35. McKechnie A.E., Wolf B.O. Partitioning of evaporative water loss in white-winged doves: plasticity in response to short-term thermal acclimation // J. Exp. Biol. – 2004. – Vol. 207 (2). – P. 203–210.

36. Mizushima N. Methods to supervise autophagy // Int. J. Biochem. Alveole Biol. – 2004. – Vol. 36 (12). – P. 2491–2502.

37. Muleme H.M., Walpole A.C., Staples J.F. Mitochondrial metabolism in hibernation: metabolic suppression, temperature effects, and substrate preferences // Physiological and Biochemical Zoology. – 2006. – Vol. 79 (3). – P. 474–483.

38. Nelson D.M., Smith S.D., Furesz T.C., Sadovsky Y., Ganapathy V., Parvin C.A., Smith C.H. Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2003. – Vol. 284. – P. 310–315.

39. Neyrinck A.M., Margagliotti S., Delzenne N.M. Insight into the involvement of Kupffer cell-derived mediators in the hepatoprotective effect of glycine upon inflammation: study on rat precision-cut liver slices // Inflamm. Res. – 2005. – Vol. 54 (3). – P. 106–112.

40. Pritchard J.B. Comparative models and biological stress // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2002. – Vol. 283. – P. 807–809.

41. Sabat P., Cavieres G., Veloso C., Canals M. Water and energy economy of an omnivorous bird: population differences in the rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*) // Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 2006. – Vol. 144. – Is. 4. – P. 485–490.

42. Scholz H. Adaptational responses to hypoxia // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2002. – Vol. 282. – P. 1541–1543.

43. Somero G.N. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living // Integrative and Comparative Biology. – 2002. – Vol. 42 (4). – P. 780–789.

44. St-Pierre J., Tattershall G.J., Boutilier R.G. Metabolic depression and enhanced O<sub>2</sub> affinity of mitochondria in hypoxic hypometabolism // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. 1205–1214.

45. Tozzi M.G., Camici M., Mascia L., Sgarrella F., Ipata P.L. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism // *FEBS Journal*. – 2006. – Vol. 273. – P. 1089–1101.
46. Washizu T., Azakami D., Bonkobara M., Washizu M., Arai T. Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in canine lymphoma cells // *J. Vet. Med. Sci.* – 2005. – Vol. 67 (6). – P. 615–616.
47. Willmore W.G., Storey K.B. Purification and properties of the glutathione S-transferases from the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans* // *FEBS Journal*. – 2005. – Vol. 272. – P. 3602–3614.
48. Yang Y.P., Liang Z.Q., Gu Z.L., Qin Z.H. Molecular mechanism and regulation autophagy // *Pharmacol.* – 2005. – Vol. 26 (12). – Vol. 1421–1434.

## СЕЛЕКЦИОННАЯ ЦЕННОСТЬ ЯРОВЫХ АНАЛОГОВ ОЗИМЫХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ

### SELECTION VALUE OF SPRING ANALOGUES OF SOFT WHEAT WINTER VARIETIES OBTAINED WITH CHEMICAL MUTAGENS

**Е.Я. Белецкая<sup>1</sup>, Л.А. Кротова<sup>2</sup>**  
**E.Y. Beletskaya<sup>1</sup>, L.A. Krotova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *ФГБОУ ВПО Омский государственный педагогический университет,  
Российская Федерация, Омск  
Omsk State Pedagogical University, Russian Federation, Omsk  
E-mail: regehr53@mail.ru*

<sup>2</sup> *ФГБОУ ВПО Омский государственный аграрный университет  
им. П.А. Столыпина, Российская Федерация, Омск  
Omsk State Agricultural University, Russian Federation, Omsk  
E-mail: kroto001@yandex.ru*

**Summary.** The paper deals with the use of chemical mutagens in spring wheat breeding, the role of induced mutations in plant improvement. The paper presents the effects of mutagen influence on some quantitative characters of spring wheat. Results showed the utility of induced mutants using in selection programs.

Мягкая пшеница имеет сложную генетическую природу благодаря ее гексаплоидности, а значит, и большой запас изменчивости. Однако, несмотря на это, происходит обеднение генофонда этой культуры в ре-

зультате использования в селекции одних и тех же доноров высокой продуктивности, устойчивости к болезням и качества зерна [Пшеничникова и др., 2005]. Кроме того, в результате скрещиваний и искусственного отбора в геномах длительно селективируемых форм накоплено много рецессивов, в связи с чем существует необходимость добиться повышения вклада в геном доминантных генов [Рапопорт, 1978]. Одним из способов преодоления этой проблемы и создания нового материала для селекции является использование химического мутагена [Рутц, 2005; Емелев, 2009; Дудин, 2009]. Среди рецессивных аллелей есть такие, которые находятся на ступени, позволяющей в случае доминантной мутации, индуцированной химическими мутагенами, осуществить возврат к доминантному фенотипу [Рапопорт, 1978; Степочкин, Артемова, 2006].

Подобная мутация возврата от рецессивной структуры к доминантной была индуцирована Р.И. Рутцем при помощи этилметансульфоната (ЭМС) и этиленимина (ЭИ). Были синтезированы яровые фенотипические аналоги озимых сортов: Мутант 3308 и Мутант 3424 – из озимой пшеницы Безостая 1, Мутант 3367 – из озимой пшеницы Безостая 2, Мутант 3370 – из сорта Краснодарская 39 путем воздействия ЭИ в концентрации 0,02%. Мутант 3514 создан из Краснодарской 39 воздействием ЭМС в дозе 0,3%. Во всех случаях обрабатывались сухие семена, использовалась 12-часовая экспозиция и 50-дневная яровизация с последующим высевом семян весной. Соблюдалась пространственная и индивидуальная изоляция растений. Работа с мутантным материалом велась по методу педигри. Генетический анализ, основанный на изучении гибридов от скрещивания яровых мутантов с исходными озимыми сортами, показал их монофакториальную природу. Отселектированные мутанты изучались нами в сравнительном эксперименте по основным компонентам продуктивности в трехкратной повторности с рандомизированным размещением делянок. Стандартом являлся широко районированный в регионе сорт яровой пшеницы Саратовская 29 (табл. 1).

В результате этой работы создан ценный исходный материал для селекции. Благодаря определенным преимуществам по комплексу хозяйственно ценных признаков перед районированными сортами, синтезированные мутанты были включены нами в широкую программу скрещиваний с целью изучения их комбинационной способности, наследования и взаимозависимости количественных признаков у гибридов, созданных на мутантной основе, а также для разработки основных направлений использования яровых мутантов в практической селекции. Выделено и передано для испытания в селекционных питомниках Западно-Сибирского селекцентра 1192 гибридные линии яровой пшеницы.

Таблица 1

**Выраженность признаков продуктивности у мутантов яровой пшеницы ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )**

Мутант	Продуктивность растений, г	Элементы главного колоса			Масса 1000 зерен, г
		Количество колосков, шт.	Озерненность, шт.	Масса зерна, г	
Мутант 3308	5,90±0,21	17,59±0,17	35,37±0,77	1,66±0,03	47,14±0,65
Мутант 3367	4,43±0,23	16,26±0,17	42,33±0,74	1,84±0,04	43,65±0,78
Мутант 3370	5,49±0,31	17,62±0,21	41,06±0,82	1,72±0,04	41,76±0,02
Мутант 3424	4,03±0,21	15,03±0,22	35,26±0,77	1,54±0,04	43,78±1,00
Мутант 3514	5,19±0,22	18,96±0,24	43,28±0,83	1,76±0,04	46,89±0,90
Саратовская 29, станд.	4,04±0,13	12,85±0,14	29,07±0,40	1,21±0,03	41,77±0,62

Получение мутаций яровости у сортов озимой пшеницы без значительных фенотипических изменений по другим признакам представляет большой практический интерес для селекции, поскольку открывает возможность улучшения сортов яровой пшеницы путем использования комплекса генов озимой пшеницы, у которой к настоящему времени достигнут более высокий биологический потенциал продуктивности [Рутц, Белецкая, 1987].

#### Список литературы

1. Дудин Г.П. Экспериментальный мутагенез и селекция ячменя // Экспериментальный мутагенез в биологии и сельском хозяйстве. Материалы II Международной научно-практической конференции: Сборник научных трудов. – Киров: Вятская ГСХА, 2009. – С. 5–8.
2. Емелев С.А. Специфичность влияния калийных удобрений на изменчивость сортов ярового ячменя // Экспериментальный мутагенез в биологии и сельском хозяйстве. Материалы II Международной научно-практической конференции: Сборник научных трудов. – Киров: Вятская ГСХА, 2009. – С. 34–40.
3. Кротова Л.А., Белецкая Е.Я., Поползухина Н.А. Использование генетического потенциала мутантов озимых форм в селекции мягкой пшеницы Западной Сибири. – Омск: Изд-во ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, 2012. – 198 с.
4. Пшеничникова Т.А. Лапочкина И.Ф., Шукина Л.В., Березовская Е.В., Труфанов В.А. Анализ наследования морфологических и биохимических признаков, контролируемых генами, интрогрессированными в мягкую пшеницу // Генетика. – 2005. – Т. 41. – № 6. – С. 793–799.
5. Рапопорт И.А. Генетические ресурсы доминантности в химическом мутагенезе и их селекционное использование // Химический мутагенез и гибридизация. – М.: Наука, 1978. – С. 3–32.
6. Рутц Р.И. Научные основы и практические результаты селекции яровой мягкой пшеницы и озимых мятликовых культур в Западной Сибири. – Новосибирск: РАСХН. Сиб. отд-ние. СибНИИСХ, 2005. – 624 с.
7. Рутц Р.И., Белецкая Е.Я. Комбинационная способность мутантов и сортов яровой пшеницы по продуктивности и элементам ее структуры // Химический мутагенез в селекционном процессе. – М.: Наука, 1987. – С. 83–89.
8. Степочкин П.И., Артемова Г.В. Анализ яровых доминантных мутаций ржи // Генетика, 2006. – Т. 42 – №12. – С. 1691–1693.

## ЗАВИСИМОСТЬ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ПРИЗНАКОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ОТ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ И СРОКОВ ХРАНЕНИЯ ОБРАБОТАННЫХ СЕМЯН

### DEPENDENCE OF SOFT WHEAT POPULATION CHARACTERS ON CHEMICAL MUTAGENS AND SHELF LIFE OF PROCESSED SEEDS

Л.А. Кротова<sup>1</sup>, Е.Я. Белецкая<sup>2</sup>  
L.A. Krotova<sup>1</sup>, E.Y. Beletskaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО Омский государственный аграрный университет  
им. П.А. Столыпина, Российская Федерация, Омск  
Omsk State Agricultural University, Russian Federation, Omsk  
E-mail: Kroto001@yandex.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО Омский государственный педагогический университет,  
Российская Федерация, Омск  
Omsk State Pedagogical University, Russian Federation, Omsk  
E-mail: regehr53@mail.ru

**Summary.** The study deals with the evaluation of store duration on population characters of spring wheat: seeds germination and survivability of plants after the seeds process by chemical mutagens. The paper presents the effects of mutagens influence (their kind, concentration) and shelf life of processed seeds on some characters of spring wheat. The contribution of these factors to variability of characters of wheat has been measured: the influence of mutagen kinds and their concentration were higher, than shelf life.

Химический мутагенез, с момента зарождения интенсивно обогащаясь, стал самостоятельной отраслью генетического знания, пополнил данные о механизме наследственной изменчивости, дал новые доказательства дискретности генного состояния. В пользу этого выступает универсальность большинства химических мутагенов, способных вызывать мутации у всех представителей живого – от вирусов до высших млекопитающих. Расширение сферы применения химического мутагенеза и его значимость для ряда актуальных (даже не генетических) проблем, начиная с онкологии и охраны окружающей среды, требуют дальнейшего всестороннего глубокого познания всех закономерностей химического мутагенеза [Рапопорт и др., 1980].

В наших исследованиях химические мутагены оказали как стимулирующее, так и ингибирующее действие на яровую мягкую пшеницу. Влияние мутагенов на популяционные признаки (всхожесть семян, выживаемость растений) зависело как от их концентрации, так и от генотипических особенностей сортов [Кротова, Белецкая, 2014].

Для изучения влияния сроков хранения обработанных химическими мутагенами семян мягкой пшеницы на популяционные признаки обработанные семена высушивали до влажности 15% и хранили при температуре около 5°C, посев проводили через 115 и 25 дней после обработки. Объектами исследований служили сорт яровой мягкой пшеницы Лютеценс 517 и химические мутагены неаналогового типа: нитрозоэтилмочевину (НЭТМ), нитрозодиметилмочевину (НДММ), нитрозодиэтилмочевину (НДЭМ), этиленимин (ЭИ), диметилсульфат (ДМС), диэтилсульфат (ДЭС), 1,4-бисдиазоацетилбутан (ДАБ). Каждый мутаген использовали в трёх концентрациях.

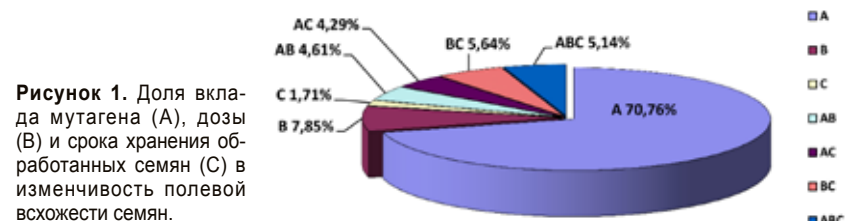
Изучение влияния сроков хранения обработанных мутагенами семян на популяционные признаки показало большую разницу по полевой всхожести семян, нежели по выживаемости растений. Полевая всхожесть семян, хранившихся до посева 115 дней, составила 12,6–106,7% к контролю, у хранившихся 25 дней семян – 20,0–118,6%, выживаемость растений первого мутантного поколения 72,9–113,8% и 85,6–110,3% соответственно. Отмечено снижение выраженности популяционных признаков в результате длительного хранения обработанных и высушенных семян в вариантах НДММ 0,05 и 0,012%; ЭИ 0,02 и 0,01%; ДАБ 0,05%. Увеличение их выраженности при более длительном хранении семян отмечено в вариантах НДММ 0,025%; ДМС 0,02 и 0,01%; ЭИ 0,005%; ДАБ 0,2 и 0,1%.

Полевая всхожесть семян при их хранении в течение длительного времени была в одних случаях ниже (8 вариантов), в других случаях наблюдалось увеличение полевой всхожести семян при длительном хранении (9 вариантов), и лишь в одном варианте (НДЭМ 0,01%) разницы не наблюдалось. Основной вклад в изменчивость полевой всхожести семян внес вид мутагена (70,76%), влияние его дозы (7,85%) и времени хранения обработанных семян (1,71%) были невелики (рис.1).

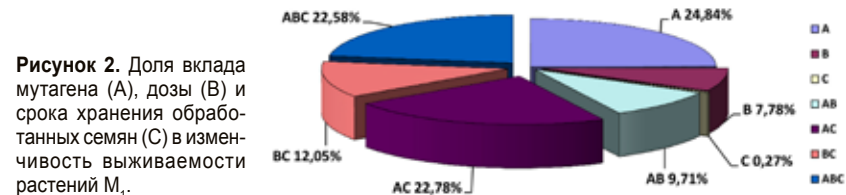
Выживаемость растений в 10 вариантах обработки была выше при длительном хранении, а в 8 вариантах – при меньшем сроке хранения обработанных семян. Доля вклада вида мутагена в изменчивость выживаемости растений  $M_1$  снизилась до 24,84%, вклад дозы мутагена был таким же как и в случае с полевой всхожестью семян (7,78%), доля вклада срока хранения семян была незначительной – 0,27%, но существенно

увеличился вклад взаимодействия факторов, особенно мутаген – срок хранения (22,78%) и мутаген – доза – срок хранения (22,58%) (рис. 2).

Снижение полевой всхожести семян и выживаемости растений  $M_1$  при длительном хранении обработанных химическими мутагенами семян до посева указывает на действие мутагенов и во время хранения семян, а повышение этих показателей – на восстановление полученных повреждений при хранении.



**Рисунок 1.** Доля вклада мутагена (А), дозы (В) и срока хранения обработанных семян (С) в изменчивость полевой всхожести семян.



**Рисунок 2.** Доля вклада мутагена (А), дозы (В) и срока хранения обработанных семян (С) в изменчивость выживаемости растений  $M_1$ .

Таким образом, при хранении обработанных химическими мутагенами семян яровой мягкой пшеницы в течение 115 и 25 дней до посева изменились популяционные признаки (всхожесть семян и выживаемость растений) по сравнению с контролем (без обработки). Полевая всхожесть семян и выживаемость растений при хранении более длительное время были в одних случаях ниже, в других – выше, чем при меньшем сроке хранения обработанных семян. Доля вклада в изменчивость признаков вида и дозы мутагена была большей, чем длительность хранения обработанных семян, что позволяет проводить обработку в удобное для исследователя время.

#### Список литературы

1. Рапопорт И.А., Шигаева И.Х., Ахматуллина И.Б. Химический мутагенез: проблемы и перспективы. – Алма-Ата: Наука Каз. ССР, 1980. – 320 с.
2. Кротова Л.А. Белецкая Е.Я. Влияние химических соединений на популяционные признаки пшеницы. Материалы II Всероссийской заочной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии и методики ее преподавания в школе и вузе». – Омск: Изд-во ОмГПУ, 2014. – С. 53–55.

## ИНДУКЦИЯ ПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ СТРЕСС ФАКТОРОВ В МНОГОКРАТНОМ РЕЖИМЕ

### INDUCTION OF PROTECTIVE ACTION OF ETHANOL IN CONDITIONS OF COMBINED MULTIPLE STRESSORS

Е.И. Антонова<sup>1</sup>, О.З. Мкртчян<sup>2</sup>, В.Е. Высокогорский<sup>3</sup>  
E.I. Antonova<sup>1</sup>, O.Z. Mkrtchan<sup>2</sup>, V.E. Vysokogorsky<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем  
биоэкологии и биотехнологии Ульяновского государственного педагогического  
университета имени И.Н. Ульянова, Российская Федерация, Ульяновск  
*Research Center of Fundamental and Applied Problems of Bioecology and  
Biotechnology of the Ulyanovsk State Pedagogical University  
named after I.N. Ulyanov, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: antonovaei1@rambler.ru*

<sup>2</sup>Омский государственный педагогический университет, кафедра биологии,  
Российская Федерация, Омск  
*Omsk State Pedagogical University, Biology Department,  
Russian Federation, Omsk*

<sup>3</sup>Омская медицинская государственная академия, кафедра биохимии,  
Российская Федерация, Омск  
*Omsk State Medical Academy, Biochemistry Department,  
Russian Federation, Omsk*

**Summary.** The changes in the activity of enzymes of energy and plastic metabolism after exposure to hyperthermia revealed by us solve two problems – the adaptation of metabolism of hypoxia due to the development of metabolic depression in birds as a protection against oxidative stress during reoxygenation period in order to maintain homeostasis according to the principle of minimum energy expenditure. Several numbers of processes that are not functioning or weakly functioning are activated in reptiles.

Метаболические аспекты алкоголизма и алкогольной интоксикации в течение многих лет является предметом фундаментальных, клинических исследований, а в настоящее время и медико-социальной проблемой современного общества является как алкогольная, так и наркотическая

зависимость. Массовое злоупотребление этими веществами приводит к увеличению случаев острых отравлений, развитию медицинских патологий, а также росту криминогенности. Формирование алкогольной и наркотической зависимости обусловлено нарушением функционального состояния различных биохимических и физиологических систем организма, многие из которых рассматриваются как первичные факторы развития заболеваний [Bardag-Gorse et al., 2002]. В патогенезе алкогольной интоксикации, наследственной предрасположенности и ассоциацией с рядом антигенов гистосовместимости (HLA B8, B14 и DR3), принимает участие синтез восстановленного никотинамиддинуклеотида (НАДН) и ацетальдегида под воздействием алкогольдегидрогеназы, который крайне токсичен и определяет повреждение белков и ДНК клетки, функциональное повреждение митохондрий, микротрубочек, антиоксидантной глутатионовой системы гепатоцитов. В тоже время этанол – вещество, которое является как естественным метаболитом организма, так и токсическим ксенобиотиком, избыточное поступление которого нарушает метаболические процессы и физиологические функции. Известны многочисленные работы морфологического профиля по изучению структурных основ влияния этанола на биологию клеточных, тканевых и органных систем: особенности роста и дифференцировки клеток, межклеточных отношений, закономерности органогенеза [Лелевич, 2004]. Между тем закономерностей взаимосвязей активности ферментных систем и структурной характеристики печёночного ациноса при различных стрессах, возможного протективного влияния фактора алкогольной интоксикации на развитие сосудистотканевых изменений в печени при гипертермическом стрессе, во многом являются предметом дискуссий.

**Материал и методы исследования.** Эксперимент поставлен на 20 белых беспородных крысах – самцах массой 170–200 г 2-х месяцев постнатального развития, 5 из которых составили контрольную группу. Острое перегревание животных достигали путем пребывания животных в течение 30 минут в воздухоventилируемой камере «Chigana» при температуре 41,5°C что приводило к повышению ректальной температуры на 2°C и развитию теплового удара средней тяжести. Моделирование этаноловой интоксикации проводили введением 25% раствора этанола из расчета 4,5 г на 1 кг массы тела крысы, что соответствовало ½ DL<sub>50</sub>. Известно, что введение этанола в эксперименте имеет выраженный гипотермический эффект. Перед перегреванием интраперитонеально животным вводили этанол и помещали в воздухоventилируемую камеру. Эксперимент сочетанного действия этанола и гипертермии моделировали трехкратно через трое суток. Забор образцов печени проводился через

один час после третьего воздействия и через сутки. Для гистологических исследований образцы печени фиксировали в 10% нейтральном формалине, заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином, по методу Ван-Гизон. Морфометрическое изучение гистологических препаратов проведено с помощью программного обеспечения Axiovisionrev 4.7 («CarlZeiss», Германия) на 1мм<sup>2</sup>, в 3 зонах печёночного ацинуса.

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на СФ-26 при λ=340 нм. Печень перфузировали холодным 0,9% NaCl, гомогенизировали на льду. Митохондриальную и цитозольную фракции в обеих моделях получали методом дифференциального центрифугирования. Регистрировали по изменению оптической плотности при изменении концентрации восстановленных форм НАД и НАДФ в нмоль субстрата/мин на мг белка [Методы биохимических исследований, 1982]. Изучали активность ферментов ЦТК НАД- и НАДФ-зависимых форм ферментов малатдегидрогеназы (МДГ) и изоцитратдегидрогеназы (ИДГ). Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ «STATISTICA-5». Различия считались значимыми при p=0,05. Для выявления сопряженности изменений признака применялся корреляционный анализ Пирсона (r).

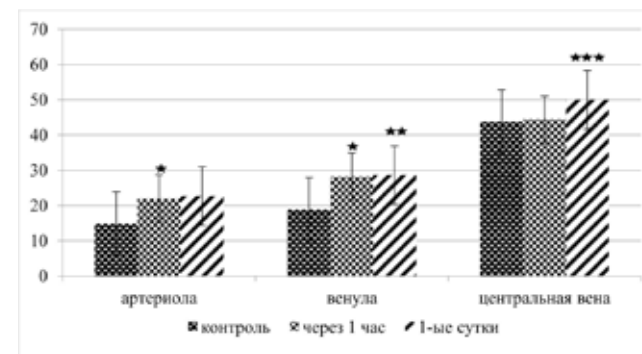
**Собственные данные и их обсуждение.** После трехкратного общего перегревания с предварительным введением этанола гистологическая картина печени характеризуется закономерностью структурных изменений. Так в острый период резко увеличивается диаметр артериол и венул портального тракта (рис. 1). Митотическая активность эпителия и количество двуядерных гепатоцитов возрастают во всех зонах, более выраженное увеличение отмечается в перивенулярной зоне, здесь же наблюдается значительное повышение количества двуядерных гепатоцитов (рис. 2, 3). Число живых гепатоцитов на тестовую поверхность достоверно снижено во всех зонах ацинуса, в наибольшей степени в области портального тракта. При сочетанном воздействии в многократном режиме перегревания и алкоголизации животных наблюдались длительные изменения активности дегидрогеназ печени. Наиболее характерным является снижение активности дегидрогеназ, за исключением увеличения активности НАДФ-зависимой ИДГ в митохондриальной фракции гепатоцитов (рис. 4).

После воздействия повреждающего фактора корреляционный анализ выявил в острый период тесную связь между показателями активности дегидрогеназ печени. Число двуядерных гепатоцитов отрицательно

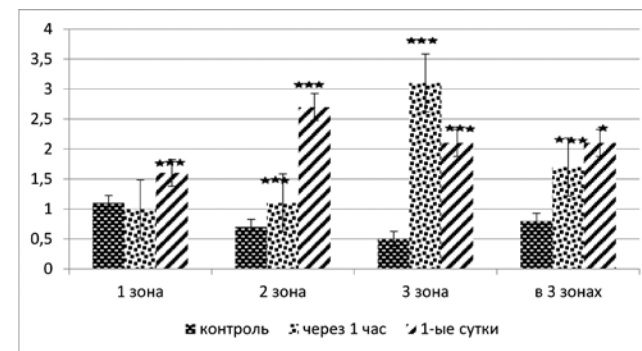
сопряжено с активностью НАДФ-зависимой ИДГ цитозоля и НАД-зависимой МДГмх, которая в свою очередь, так же отрицательно, коррелирует с диаметром венулы портального тракта (рис. 5).

Следовательно, снижение показателей пластического, энергетичес-

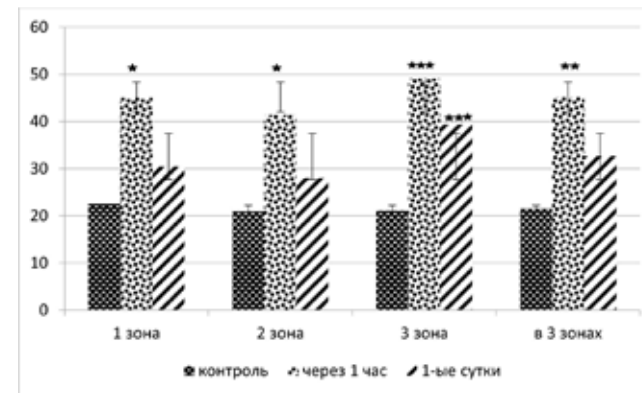
**Рисунок 1.** Динамика изменения показателей микроциркуляторного русла печеночного ацинуса.

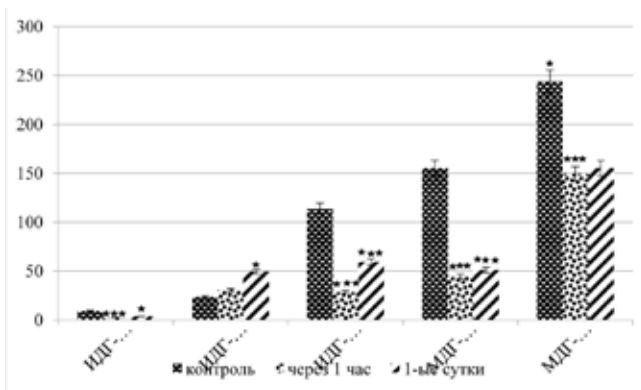


**Рисунок 2.** Митотическая активность гепатоцитов.

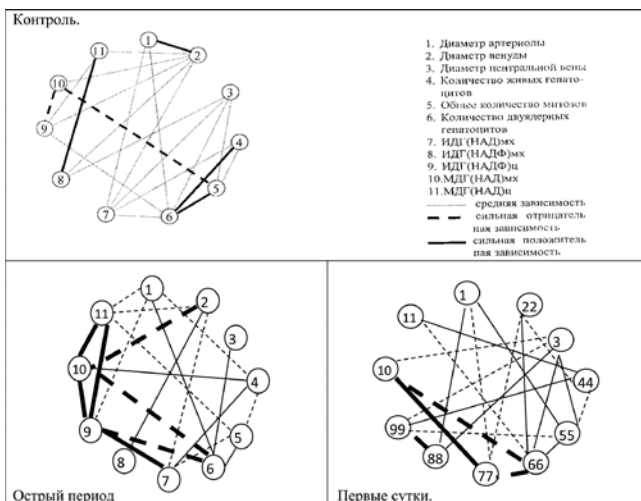


**Рисунок 3.** Динамика числа двуядерных форм гепатоцитов.





**Рисунок 4.** Динамика активности ферментов цикла трикарбоновых кислот.



**Рисунок 5.** Гистоэнзиматические корреляции.

кого обменов и детоксикации влияют на механизм митотического деления, что проявляется в повышении числа ацитокинетических митозов. В то же время, увеличение диаметра венулы приводит к снижению уровня обеспеченности липогенеза, детоксикации, энергетического обмена. Корреляционный анализ на 1-е сутки (рис. 5) после воздействия сочетанных стресс-факторов выявил тесную положительную сопряженность между НАД-зависимыми дегидрогеназами митохондрий. Они, в свою очередь, отрицательно коррелируют с количеством двуядерных гепатоцитов. Также отрицательно сопряжены между собой НАДФ-зависимые дегидрогеназы митохондрий и цитозоля. Отличительной особенностью этого периода является резкое снижение количества тесных корреляци-

онных связей и отсутствие сопряженности между просветом сосудов и активностью дегидрогеназ. Что характерно для однократного введения этанола без сочетания с гипертермией; гипертермия в однократном режиме, напротив определяет тесную связь между собой активности дегидрогеназ, репаративной регенерации и показателей микроциркуляторного русла ациноса [Dixon et al., 2013]. Увеличение числа ацитокинетических митозов, а следовательно и числа двуядерных гепатоцитов, может быть следствием угнетения процессов энергетического обмена и нарушения структуры митохондрий. Морфометрические показатели сосудов печеночного ациноса обнаруживают значительную и стойкую картину нарушения кровообращения. Начиная с острого периода сосуды портального тракта расширены. Наибольший диаметр у артериолы отмечается в остром периоде; венулы – в острый период и на первые сутки; центральная вена на 1 сутки. Существенным признаком морфофункционального состояния печеночного ациноса является количество живых гепатоцитов на тестовую площадь среза. Их минимальное количество отмечается в остром периоде в перипортальной зоне. Это обусловлено очаговыми некротическими изменениями паренхимы печени под влиянием внешних токсинов, поступающих в эту зону с током крови. Этот период можно считать критическим после многократного моделирования сочетанных стрессфакторов. Подтверждением тому может служить и активность оксидоредуктаз: минимальное значение активности НАД-зависимых МДГ в цитозоле и митохондриях гепатоцитов приходится на острый период. Снижение активности дегидрогеназ может отражать нарушение структуры митохондрий и способствовать развитию гипоксического эффекта. Однако, наряду со снижением активности оксидоредуктаз, наблюдалось увеличение активности НАДФ-зависимой ИДГ митохондрий, что является характерным для алкогольной интоксикации. Возможно, это результат адаптивной реакции окислительных процессов, переключение НАД-зависимых реакций на НАДФ-зависимые пути, которые являются источником НАДФ для монооксигеназных процессов. Активация НАДФН-зависимых ИДГ в условиях алкоголизации может способствовать генерированию восстановленных эквивалентов для липогенеза, характерного, в ранние сроки алкогольной интоксикации. При многократной алкогольной интоксикации восстановленные формы НАДФН могут использоваться не только для синтеза жирных кислот, но и для биотрансформации экзогенного этанола [Антонова и др., 2003; Yoshihara et al., 2001]. Параллельно с процессами деструкции, нарушения кровоснабжения, лейкоцитарной инфильтрацией и формированием очагов некроза, разворачиваются процессы репаративной регенерации.

Они проявляются в повышении уровня митотической активности и за счет увеличения числа двуядерных гепатоцитов. Наиболее высокий уровень митотической активности приходится на 1-е сутки эксперимента, а количество двуядерных гепатоцитов в острый период. Многократное сочетанное действие повреждающих факторов приводит к мобилизации обеих форм репаративной регенерации в течение всего восстановительного периода, за исключением первых суток, когда репаративная регенерация идет в большей степени за счет увеличения числа ацитокинетических митозов.

Таким образом, моделирование перегревания с предварительной этаноловой интоксикацией в многократном режиме проявляется в увеличении просвета сосудов печеночного ацинуса, в большей степени, венозного звена; мобилизации обеих форм репаративной регенерации; снижении количества живых гепатоцитов; угнетении энергетического, пластического обменов и процессов детоксикации. Корреляционный анализ также выявил: основные корреляционные сопряженности формируются между активностью дегидрогеназ; показателями венозного звена сосудистого русла печеночного ацинуса и активностью дегидрогеназ; а также между активностью дегидрогеназ и числом двуядерных форм гепатоцитов, как показателя пролиферативного потенциала печеночного ацинуса.

#### Список литературы

1. Антонова Е.И. Мкртчян О.З., Высокогорский В.Е. Сопряженность метаболических и структурных показателей печеночного ацинуса в условиях моделирования этаноловой интоксикации / Материалы научной конференции, посвященной 150-летию П.М. Альбицкого, 9–10 октября 2003 г. «Молекулярные механизмы типовых патологических процессов». – СПб., 2003. – С. 7–8.
2. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Универ-т. – 1982. – 380 с.
3. Лелевич С.В. Сравнительная характеристика метаболизма глюкозы в печени крыс при острой алкогольной и морфиновой интоксикации // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – Вып. 6. – С. 615–623.
4. Bardag-Gorce F., French B.A., Li J., Riley N.E., Yuan Q.X., Valinluck V., Fu P., Ingelman-Sundberg M., Yoon S., French S.W. The importance of cycling of blood alcohol levels in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease in rats // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 123. – Is. 1. – P. 325–335.
5. Dixon L.J., Barnes M., Tang H., Pritchard M.T., Nagy L.E. Kupffer Cells in the Liver // Comprehensive Physiology. – 2013. – Vol. 3. – P. 785–797.
6. Yoshihara T., Hamamoto T., Munakata R., Tajiri R., Ohsumi M., Yokota S. Localization of Cytosolic NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase in the Peroxisomes of Rat Liver Cells // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 2001. – Vol. 49 (9). – P. 1123–1131.

## СЕКЦИЯ 3. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ (БИОТЕХНОЛОГИЯ)

### РНФ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *ESCHERICHIA COLI*

### RPI FOR THE IDENTIFICATION OF *ESCHERICHIA COLI*

А.П. Воротников, Н.И. Молофеева  
A.P. Vorotnikov, N.I. Molofeeva

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** The paper studies a new method for detecting *E. coli* O157 in food and privately in the meat. Also, this method is suitable for research of water contamination with *Escherichia coli*. During study researches it was established that RPI (reaction of phage titer increase) able indicate the presence of a pathogen, even if it is present at a concentration of  $10^3$  МК/г.

Согласно литературным данным, заражение людей *E. coli* O157 происходит чаще всего при употреблении пищевых продуктов, поэтому разработка методов выявления вышеуказанных микроорганизмов в мясе и в других продуктах питания имеет актуальное значение [Калдыркаев и др., 2013; Мустафин и др., 2009; Феоктистова и др., 2008].

Кусочки свинины массой 5–10 г растирали в стерильной фарфоровой ступке и вносили в колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторную культуру *E. coli* O157 штамм РЛ и № 51659 в концентрации  $10^5$ ;  $10^4$ ;  $10^3$ ;  $10^2$ ;  $10^1$  м.к./мл и брали колбы с пробой мяса не контаминированного бактериями *E. coli* O157 [Феоктистова и др., 2011а, 2011б].

Содержимое колб встряхивали в шуттельаппарате с последующим отстаиванием взвеси в течение 10 минут. Приготавливали для опытной и контрольной проб по 6 широких пробирок (диаметр 20 мм) и нумеровали их (1, 2, 3 и соответственно 1к, 2к и 3к – для каждого разведения культуры). В пробирки № 1, 2 и 1к, 2к вносили по 9 мл исследуемой

взвеси мяса, в пробирки № 3 и 3к – 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1, 3 и 1к и 3к добавляли 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении, а в пробирки № 2 и 2к вносили по 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага).

Рабочее разведение фага должно содержать  $1 \times 10^4$  БОЕ в 1 мл. При титре фага, равном  $2 \times 10^8$  БОЕ в 1 мл, фаг разводили 1:10000, при титре фага, равном  $1-2 \times 10^9$  БОЕ в 1 мл – 1:100000 [Vasylyeva, 2012].

Пробирки №1 и 1к, в которых находились взвеси мяса и индикаторный фаг, являлись опытными. Пробирки № 2 и 2к – без фага были контрольными для выявления в пробах мяса свободного фага. Пробирки № 3 и 3к – контроль на титр индикаторного фага.

После культивирования при температуре  $37^\circ\text{C}$  содержимое каждой пробирки разводили МПБ (рН 7,4–7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирки №3 и 3к (контроль на титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний (зон лизиса) фага. В пробирке № 3 и 3к индикаторный фаг находился в концентрации нескольких тысяч БОЕ в 1 мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков БОЕ в 1 мл, содержимое пробирки № 3 разводили в 20 раз, т.е. 0,25 мл исследуемой смеси вносили в 4,5 мл МПБ. Содержимое опытных пробирок № 1, 1к и № 2, 2к разводили аналогично [Васильев и др., 2014а, 2014б; Викторов и др., 2013; Насибуллин и др., 2013].

Ввиду того, что селекционированные нами фаги являются термостабильными, то инактивацию микрофлоры разведенных смесей пробирок №1 и 1к, № 2 и 2к, № 3 и 3к мы проводили путем прогревания в водяной бане при температуре  $58-60^\circ\text{C}$  в течение 30 минут. После этого содержимое пробирок исследовали на количество БОЕ бактериофага методом агаровых слоев по Грация [Феоктистова и др., 2012а, 2012б].

Для исследования методом агаровых слоев использовали МПА, содержащий 1,5%; 0,7% агара. 1,5% мясопептонный агар разливали в чашки по 25–30 мл. Чашки подсушивали в термостате в течение 2–3 часов.

Индикаторные культуры эшерихий выращивали в МПБ в течение 18 часов. МПА с 0,7%-ным содержанием агара заготавливали заранее в пробирках по 2,5 мл, расплавляли, охлаждали до температуры  $46-48^\circ\text{C}$ . В пробирку вносили 0,2 мл бульонной культуры и 1 мл разведенной и прогретой исследуемой смеси, перемешивали и выливали вторым слоем на чашки с 1,5%-ным МПА. Через 20–30 минут после застывания верхнего слоя агара чашки помещали в термостат на 12–16 часов.

Увеличение титра фагов Е-61 УГСХА и Е-67 УГСХА более чем в 5 раз произошло уже при концентрации  $10^3$  микробных клеток эшерихий в 1 г мяса.

При исследовании контаминированного эшерихиями МПБ, водопроводной воды, мяса, были получены схожие результаты: положительная РНФ (реакция нарастания титра фага) была при минимальной концентрации эшерихий в материале  $10^3$  м.к./г.

При концентрации бактерий  $10^1$  м.к./г исследуемого материала увеличение количества БОЕ было в пределах; 1,1 и 1,4 раз – при исследовании мяса (отрицательная реакция); 1,1 и 1,5 раз (отрицательная реакция) – при исследовании воды.

Изменение концентрации микроорганизмов до  $10^2$  м.к./г увеличивало количество БОЕ фагов в 1,3 и 1,6 раза – при исследовании мяса (отрицательная реакция); 1,3 и 1,7 раз (отрицательная реакция) – при исследовании воды.

Таким образом, результаты проведенной серии опытов свидетельствуют о положительной РНФ при концентрации эшерихий  $10^3$  м.к./г и более как в МПБ так и в воде и мясе.

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Артамонов А.М., Гринева Т.А., Ляшенко Е.А., Разработка методов фагоидентификации и фагодетекции бактерий *Pseudomonas fluorescens* // Фундаментальные исследования. – 2014а. – № 5. – Ч. 1. – С. 55–58.
2. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Насибуллин И.Р., Золотухин С.Н., Нафеев А.А., Горшков И.Г., Куклина Н.Г., Барт Н.Г. Детекция *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов с применением биосенсоров на основе гомологичных бактериофагов // Фундаментальные исследования. – 2014б. – № 5. – Ч. 1. – С. 50–54.
3. Викторов Д.А., Васильев Д.А., Артамонов А.М., Индикация бактерий *Pseudomonas fluorescens* методом реакции нарастания титра фага // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23–25 апреля 2013. – Т. 1. – Ульяновск, 2013. – С. 159–162.
4. Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Под ред. Васильев Д.А., Золотухин С.Н. – Ульяновск, 2013. – С. 211–225.
5. Мустафин А.Х., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Роль *Bacillus subtilis* в обсеменении пищевых продуктов // Вклад молодых ученых в отраслевую науку с учетом современных тенденций развития АПК: материалы всероссийской науч. практ. конф. – Москва. – 2009. – Т. 2. – С. 70–72.
6. Насибуллин И.Р., Горшков И.Г., Куклина Н.Г., Викторов Д.А., Васильев Д.А., Нафеев А.А. Применение реакции нарастания титра фага для индикации азромонад в рыбной продукции // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы между. научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23–25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 158–161.
7. Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Ягфаров О.М. Теоретические основы товароведения и экспертизы. Учебно-методический комплекс. Т. 1. – Ульяновск: УГСХА, 2008. – С. 144.
8. Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Меркулов А.В. Перспективы применения бактерио-

фагов рода *Bacillus* // Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск. – 2011а. – С. 136–139.

9. Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Юдина М.А. Перспективы применения бактериофагов для индикации и идентификации бактерий вида *Bacillus cereus* в речной воде и рыбе // Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации. – Ульяновск. – 2011б. – С. 175–180.

10. Феоктистова Н.А., Меркулова Е.В., Юдина М.А. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012а. – С. 14–17.

11. Феоктистова Н.А., Садеева Н.Т., Меркулова Е.В. Заболевания, вызывает бактериями вида *Bacillus cereus* // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск. – 2012б. – С. 25–30.

12. Vasylyeva Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 43. – № 4. – С. 44–46.

## ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*

### THE STUDY OF ENZYMATIC PROPERTIES *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*

**А.П. Воротников, Д.А. Викторов**  
**A.P. Vorotnikov, D.A. Viktorov**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** This paper studies the biochemical properties of the bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. During study researches it was established that these bacteria utilize urea and lactose.

Поскольку *Flavobacterium psychrophilum* способны вызывать массовую гибель рыбы [Викторов и др., 2014], исследование данного микроорганизма видятся целесообразными, поскольку в дальнейшем на их основе имеется возможность разработки средств диагностики и лечения заболевания, вызываемого бактерией *F. psychrophilum* [Куклина и др.,

2013]. *F. psychrophilum* – граммотрицательная палочковидные аэробы 2–5 мкм в длину 0,3–0,5 мкм в диаметре с округлыми или заостренными концами. Температурный оптимум в пределах 4–12 °С. [Петрукова и др., 2014; Васильев и др., 2013] В лабораторных условиях выращивается при комнатной температуре. На агаре дает колонии R-формы желтого цвета (от кремовых до оранжевых) [Куклина и др., 2013; Петрукова и др., 2014]. Широко распространяются в почве и пресноводных водоёмах [Васильев и др., 2013, 2014; Калдыркаев и др., 2013; Калдыркаев и др., 2013; Нафеев и др., 2014; Никульшина и др., 2008; Никульшина и др., 2007; Петрукова и др., 2014; Романова и др., 2014; Райчинец и др., 2014; Феоктистова и др., 2012а, 2012б; Vasylyeva, 2013].

Целью исследования являлось определение биохимических свойств бактерий *F. psychrophilum*. Данная цель достигалась путем исследования штаммов Fp 2, 16, 32, 570, 572, 365, 3008, которые были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина.

Результаты тестов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Биохимические свойства *F. psychrophilum*

Биохимические свойства	Штаммы <i>F. psychrophilum</i>						
	Fp2	Fp16	Fp32	Fp570	Fp572	Fp365	Fp3008
Арабиноза	+	+	+	+	-	-	+/-
Манноза	+	-	+	+	-	+/-	-
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-
Триптофандезаминаза	-	-	-	-	-	-	+/-
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
Аргининдегидролаза	+	+	+/-	+	-	+	+
Нитраты	+	+	+	+/-	+	+	+/-
Маннит	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+
Сорбат	+	+	+	-	-	+	+/-
Адонит	-	-	-	-	-	-	-
Эскулин	-	-	-	-	-	-	-
Уреаза	+	+	+	+	+	+	+
Цитрат натрия	-	+	+	-	+	-	+
Ацетат натрия	-	+	+	-	+/-	-	+
Индол	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-

Все тесты ставились при температуре 10–15°C. Охлаждение чашек обеспечивалось хладоэлементами. При постановке опытов в термостате на 37°C рост полностью отсутствовал, в термостате на 28°C рост отмечался лишь на третий день постановки опыта у трех штаммов. При температуре ниже 15°C рост отмечался через 24 часа после посева.

В результате проведенных работ было обнаружено, что *F. psychrophilum* способен утилизировать мочевину и лактозу. Мочевина (карбамид) угнетает рост микроорганизмов, что позволяет использовать её как селективный компонент питательных сред для *F. psychrophilum*. Использование лактозы в качестве источника углерода позволяет комбинировать оба выше представленных признака для разработки методов индикации и идентификации в дополнение к морфологическим и культуральным свойствам.

**Выводы.** В ходе проведенных работ было выявлено, что культура *F. psychrophilum* наиболее быстро растет в оптимуме температур 10–15°C. Также были определены биохимические свойства Флавобактерий, некоторые из которых позволяют использовать их в качестве основы для создания среды, обеспечивающей наиболее быстрый рост *F. psychrophilum*.

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25). – С. 68–76.
2. Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. – С. 126–131.
3. Виктор Д.А., Воротников А.П., Парамонова Н.А., Васильев Д.А. Результаты изучения биохимических свойств *Flavobacterium psychrophilum* // Международный научно-исследовательский журнал (Research Journal of International Studies). – 2014. – № 2–1 (21). – С. 53–54.
4. Калдыркаев А.И., Алешкин А.В., Феоктистова Н.А. Биохимические свойства бактерий *Bacillus cereus* / Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – Саратов, 2013. – С. 186–188.
5. Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / Ред. Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 211–225.
6. Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. – С. 178–185.
7. Куклина Н.Г., Горшков И.Г., Виктор Д.А., Васильев Д.А. Изучение культуральных свойств бактерии вида *Aeromonas salmonicida* // Аграрная наука и образование на современном

этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции, Ульяновск, 11 июня 2013. – Т. 2. – С. 81–83.

8. Нафеев А.А., Пелевина Н.И., Васильева Ю.Б. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями // Дезинфекционное дело. – 2014. – № 1. – С. 39–43.

9. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Хлынов Д.Н. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования». – Ульяновск: УГСХА. – Т. IV. – 2008. – С. 57–59.

10. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Никулина Е.Н. Разработка методов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, выделенных от домашних животных // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4 (23). – С. 103–106.

11. Петрукова Н.А., Феоктистова Н.А., Лыдина М.А. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах // Экология родного края: проблемы и пути их решения: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2014. – С. 375–377.

12. Райчинец Ю.А., Феоктистова Н.А., Лыдина М.А., Бадаев Р.Р., Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Мерчина С.В., Швиденко И.Г. Методика выделения *Paenibacillus larvae* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14787>

13. Романова Н.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 1 (64). – С. 26–27.

14. Феоктистова Н.А., Меркулова Е.В., Юдина М.А. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. – С. 14–17.

15. Феоктистова Н.А., Садеева Н.Т., Меркулова Е.В. Заболевания, вызывает бактериями вида *Bacillus cereus* / Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. – С. 25–30.

16. Vasylyeva Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 43. – № 4. – С. 44–46.

## КОСМЕТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА С БАКТЕРИОФАГАМИ

### COSMETICS WITH BACTERIOPHAGES

**Е.П. Гановичева, Р.Р. Низамова, Д.М. Насибуллина,  
Р.Р. Ибрагимова, И.С. Галушко, Н.Г. Барт  
E.P. Ganovicheva, R.R. Nizamova, D.M. Nasibullina,  
R.R. Ibragimova, I.S. Halushko, N.G. Bart**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** Work is devoted to the use of bacteriophages in cosmetology. Study of bacteriophages used in the manufacture of cosmetics specificity.

Использование биологических методов защиты микрофлоры – ноу-хау компании Фаберлик. Принцип действия построен на использовании бактериофагов – природных биоограничителей чужеродных (болезнетворных) микроорганизмов. Разработка фаговых коллекций проводится компанией ООО «НПЦ Микромир». В каждое средство введена своя коллекция бактериофагов, активных в отношении одноименных бактерий-патогенов. Способ введения в гель живых активных бактериофагов и сохранение их активности при заявленных условиях хранения – это сложный микробиологический процесс, который запатентован нашим разработчиком Панюшиным С.К. Вся продукция сертифицирована в соответствии с законодательством РФ и имеет Свидетельство о государственной регистрации с экспертным заключением о соответствии продукции Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам и Декларацию о соответствии. Вся продукция прошла клинические испытания и имеет протоколы: токсикологических исследований, микробиологических испытаний, клинической апробации и химико-аналитических испытаний. Клинические испытания проводились в ЗАО Медицинском центре косметологической коррекции «ЭКЛАН» и Испытательном лабораторном центре Центральной клинической больницы (ЦКБ РАН). Очень высокая эффективность препаратов доказана в Федеральном государственном учреждении здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии № 133» ФМБА. В 2008 году гигиени-

ческим средствам присуждена Золотая медаль им. Чижевского – высший наградной знак Академии Медико-Технических наук. «За большие заслуги в развитии науки, разработку концепции производства серии био-препаратов с бактериофагами, развивающей ряд основных положений научных школ академиков РАМН А.А. Воробьева и И.Н. Блохиной». В декабре 2011 года косметика данной фирмы получила высшую оценку совета «Знак качества XXI века» и экспертной комиссии. Косметике «Сенгара» присужден «Золотой Знак Качества XXI века» [Натидзе, 2005; Vasylyeva, 2013].

Нами было взято два гель-спрея (гель-спрей для полости рта с бактериофагами и пребиотиками; гель-спрей для рук – биологические перчатки) произведено ООО «НВЦ Агроветзащита С.-П.», Россия, Московская область, г. Сергеев Посад, по заказу ООО «Сенгара» эксклюзивно для ОАО «Фаберлик» и проверено на наличие заявленных бактериофагов (*Wolinella* spp., *Actinomyces* spp., *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter* spp., *Bacteroides* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* spp.).

Специфичность характеризуется наличием или отсутствием литической активности бактериофагов в отношении гетерологичных бактерий [Васильев и др., 2013а; 2014 а; 2014b]. Изучение специфичности бактериофагов проводили на плотном питательном агаре методом нанесения капель фагов на газон исследуемой культуры. Изучение специфичности бактериофагов *Wolinella* spp., *Actinomyces* spp., *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter* spp., *Bacteroides* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* spp. проводили по отношению к представителям следующих видов: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Proteus vulgaris* [Барт и др., 2013; Васильев и др., 2011, 2013b, 2013c, 2013d]

На поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносили 3–4 капли 18-часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпательем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15–20 минут. После чего на чашках размечали маркером два сектора: на первый сектор засеянного агара легким прикосновением пипетки наносили капли исследуемого бактериофага; на второй сектор по центру в качестве контроля наносили стерильный МПБ. Чашки наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37°C. Оценку результатов проводили через

18–24 часа. [Васильева и др., 2014; Калдыркаев и др., 2013а; Калдыркаев и др., 2013б; Романова и др., 2013; Петрунова и др., 2011]

Установлено, что заявленные фаги неактивны по отношению к представителям бактерий использованных нами в исследовании, но это не позволяет нам утверждать, что данные бактериофаги не присутствуют в составе названных гель-спреев. Взятые нами микроорганизмы из музея кафедры не являются индикаторными культурами, что и не позволило выявить бактериофаги.

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В., Барт Н.Г., Богданов И.И., Васильева Ю.Б., Викторов Д.А., Золотухин Д.С., Журавская Н.П., Калдыркаев А.И., Карамышева Н.Н., Ковалева Е.Н., Коритняк Б.М., Ляшенко Е.А., Молофеева Н.И., Пожарникова Е.Н., Пульчеровская Л.П., Семанина Е.Н., Феоктистова Н.А. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск. – 2013. – 316 с
2. Барт Н.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. // Выделение бактериофагов рода *Providencia*. – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. – 75 с
3. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алешкин А.В. Бактериофаги рода *Bacillus* / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; НИИЦМиБ. – Ульяновск. – 2013а. – 80 с.
4. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Артамонов А.М., Гринева Т.А., Ляшенко Е.А. Разработка методов фагоидентификации и фагодетекции бактерий *Pseudomonas fluorescens* // Фундаментальные исследования. – 2014а. – № 5–1. – С. 55–58.
5. Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Васильева Ю.Б. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1 (13). – С. 59–62.
6. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Семанина Е.Н. Разработка методов выделения и селекции бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013б. – Т. I. – С. 28–32.
7. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* в объектах санитарного надзора // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014б. – № 1 (25). – С. 68–76.
8. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Семанина Е.Н. Технология конструирования диагностического биопрепарата на основе бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и перспективы его применения // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013с. – Т. II. – С. 99–104.
9. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И. Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск. – 2013д. – С. 126–131.
10. Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>
11. Калдыркаев, А.И., Алешкин А.В., Феоктистова Н.А. Биохимические свойства бактерий

*Bacillus cereus* // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – Саратов. – 2013а. – С. 186–188.

12. Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск. – 2013б. – С. 178–185.

13. Натидзе Л. Бактериофаги в ветеринарии: реальность и перспективы // Перспективы использования препаратов бактериофага для профилактики и лечения инфекции, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: матер. междунар. семинара. – Тбилиси. – 2005- 15 с.

14. Петрукова Н.А., Феоктистова Н.А., Лыдина М.А. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах // Экология родного края: проблемы и пути их решения: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – 2014. – С. 375–377.

15. Романова Н.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 1 (64). – С. 26–27.

16. Vasylyeva Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 43. – № 4. – С. 44–46

#### ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

#### A TEST-SYSTEM FOR RAPID DIAGNOSIS OF AFRICAN SWINE FEVER

**О.А. Дубровская, А.С. Казакова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин**  
**O.A. Dubrovskaya, A.S. Kazakova, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: [grant-ugsha@yandex.ru](mailto:grant-ugsha@yandex.ru)

**Summary.** The article is devoted to the definition of diagnostic sensitivity and specificity of a test-system for rapid diagnosis of African swine fever (ASF) through the detection of virus-specific antibody by immunoblotting assay with using nitrocellulose immunostrips containing recombinant protein p30 polypeptide immobilized on them.

Согласно рекомендациям МЭБ, подтверждающим тестом на наличие антител в сыворотках крови свиней является иммуноблоттинг (поста-

новка реакции около 2–3 часов), который применяют, в том числе, при нарушении условий хранения проб [Immunoblotting OIE...; Manual of diagnostic tests and vaccines...].

**Целью** данной работы является показать перспективы использования реакции иммуноблоттинга для выявления антител к вирусу АЧС на основе современных рекомбинантных биотехнологий.

В соответствии с поставленной целью работы сформулирована задача исследования, заключающаяся в определении диагностической чувствительности и специфичности разработанной тест-системы при исследовании полевых проб с предпосылкой дальнейшего её внедрения в лабораторную диагностику АЧС.

**Материалы и методы.** Для определения чувствительности и специфичности разработанной тест-системы проводили исследование 100 полевых образцов, из них 47 проб 20% суспензий селезенки (29 – от кабанов и 18 – от домашних свиней, положительных – 29, отрицательных – 18) и 53 образца сывороток крови (50 – от свиней, 3 – от кабанов, положительных – 40, отрицательных – 13, из них 2 сыворотки от свиней, иммунных к вирусу КЧС).

Также проводили титрование с двукратным шагом с 1:8 специфических сывороток крови свиней № 1, 2, 3, к аттенуированному вирусу АЧС шт. Ставрополь 01/08 А<sub>4</sub>С<sub>2</sub>/9к (33 п.), полученных на 3, 7, 15 и 28 сут. после заражения [Прудникова, 2013; Васильева и др., 2013, 2014].

В качестве положительного контроля реакции (К+) использовали специфическую сыворотку крови свиньи (SS), иммунную к аттенуированному вирусу АЧС шт. Ставрополь 01/08 А<sub>4</sub>С<sub>2</sub>/9к (24 п.) VIII сероиммунотипа (28 сут. после контрольного заражения) с титром антител (АТ) в РЗГАд 1:320, полученную из коллекции лаборатории «Музейных штаммов» ГНУ ВНИ-ИВВиМ Россельхозакадемии, в разведении 1:20 [Прудникова, 2013; Васильев и др., 2010; Казакова, 2013]. Отрицательным контролем реакции (К-) являлась сыворотка крови интактного животного (NS) в разведении 1:20.

Постановку реакции иммуноблоттинга осуществляли, основываясь на методике, предложенной J.M. Escribano и E. Tabares [Escribano, Tabares, 1987; Dixon et al., 2000; Pérez-Filgueira et al., 2006; Pan et al., 1984; Vasylyeva, 2013].

**Результаты исследований.** При определении специфичности и чувствительности тест-системы установили, что из 100 исследуемых полевых образцов (69 – положительных и 31 – отрицательных) 4 были ложнонегативными и 1 – ложнопозитивным. Результаты статистической обработки показали, что специфичность тест-системы составляет 96,77%, чувствительность – 94,20%.

**Заключение.** В результате проведенных исследований определены диагностическая специфичность и чувствительность разработанной «Тест-система для экспрессдиагностики АЧС для выявления антител к вирусу методом иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного белка р30». Установлено, что при исследовании полевых проб сывороток крови и селезенки от больных и павших свиней и кабанов специфичность и чувствительность составляют 96,77% и 94,20% соответственно, что дает предпосылки для дальнейшего её усовершенствования и внедрения в лабораторную диагностику.

#### Список литературы

1. Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>
2. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч. 2. – С. 334–338.
3. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 230–232.
4. Казакова, А.С. Конструирование продуцентов рекомбинантных белков р72, р30 и р54 вируса африканской чумы свиней: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.02: защищена 16.05.2013 / Казакова Анна Сергеевна. – Покров, 2013. – 137 с.
5. Прудникова Е.Ю. Адаптация вируса африканской чумы свиней, выделенного на территории Российской Федерации, к перевиваемым культурам клеток и изучение его биологических свойств: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02: защищена 26.12.2013. – Покров, 2013. – 27 с.
6. Escribano J.M., Tabares E. Proteins specified by African swine fever virus V. Identification of immediate early, early and late proteins // Arch. Virol. – 1987. – Vol. 92. – P. 221–238.
7. Dixon K., Costa J.V., Escribano J.M., Rock D.L., Vinuela E., Wilkinson P.J. / M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carestens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B.F.A. Wickner, C.M. Murphy, D.H.L. Fauquet, S.A. Bishop, A.W. Ghabrial, G.P. Jarvis, M.D. Martelli (eds). Family Asfarviridae. L. Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – San Diego: Summers Academic Press, 2000. – P. 159–165.
8. Immunoblotting OIE for Serological Diagnosis of African Swine Fever (SOP/CISA/ASF/IB/1/2008) [Электронный ресурс]. URL: <http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SOPs/SOP-AFSIB12008.pdf>
9. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.8.1. African swine fever / Office International des Epizooties [Электронный ресурс]. – Paris, France, 2008. – 6th ed. URL: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.08.01\\_ASF.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.08.01_ASF.pdf). Pérez-Filgueira D.M., González-Camacho F., Gallardo C., Resino-Talaván P., Blanco E., Gómez-Casado E., Alonso C., Escribano J.M. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 9. – P. 3114–3121.
10. Pan I.C., Hess W.R. Virulence in African swine fever: its measurement and implications // Am. J. Vet. Res. – 1984. – Vol. 45. – № 2. – P. 361–366.
11. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 45. – № 6. – С. 81–85.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ ПСЕВДОМОНОЗЕ РЫБ

### PROSPECTS OF APPLICATION OF BACTERIOPHAGES IN PSEUDOMONAS FISH

А.В. Кафидова, Т.А. Гринева  
A.V. Kafidova, T.A. Grinyova

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** Work is devoted to the development of a biological product based on bacteriophage active against bacteria of the genus *Pseudomonas*. The novelty of this drug – allocation bacteriophage active against major pathogens pseudomonosis fish, development of diagnostic biological product based on them. In addition, isolated bacteriophages prospectively used as part of the therapeutic and prophylactic biological product, which will destroy the disease agent without affecting the normal flora of the intestine and fish ponds.

Псевдомонозы рыб – это опасное заболевание, встречающееся на рыбоводческих хозяйствах [Викторов и др., 2013]. При остром течении инфекции рыбы вялые, слабо реагируют на внешние раздражители, хаотично плавают у поверхности воды. На брюшной стенке, плавниках, жаберных крышках, в склере глаз – кровоизлияния. Брюшко увеличено в объеме, мягкой консистенции. Отмечают одно- или двустороннее пучеглазие. Анальное отверстие обычно воспалено и выпячено. Псевдомонозы вызывают гибель отдельных особей, а зачастую и массовый мор, что наносит ущерб рыбоводческим хозяйствам [Гринева и др., 2013].

Современные доступные для рыбоводческих хозяйств методы диагностики далеко не совершенны. Диагноз на псевдомонозы ставят на основании результатов бактериологического исследования с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений. Типирование до вида при этом не производится, так как существующие методы бактериологической диагностики требуют значительных затрат времени и материалов, а современные методики требуют дорогостоящего оборудования, материалов и высококвалифицированных

специалистов, что зачастую недоступно для рыбоводческих хозяйств [Васильев и др., 2011; Васильева и др., 2013; Барт и др., 2013].

Поскольку существующие методы диагностики не предусматривают типирование возбудителей до вида, лечение заболевания заключается в применении антибиотиков широкого спектра [Васильев и др., 2013а].

Авторами работы предлагается биопрепарат на основе бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Pseudomonas*, для диагностики, лечения и профилактики псевдомонозов рыб. Фаги обладают избирательностью литического действия в отношении определенных видов бактерий. Индикаторный фаг не реагирует на присутствие в исследуемых образцах посторонней микрофлоры, что дает возможность проводить индикацию того или иного возбудителя без его выделения в чистой культуре [Васильев и др., 2013б; Барт и др., 2009а; Барт и др., 2009в;]. Это позволяет применять биопрепараты на основе бактериофагов для точной дифференциации, индикации и типирования бактерий до вида, что крайне важно для назначения эффективного лечения.

Помимо фагодиагностики инфекций, бактериофаги целесообразно применять и для лечения заболеваний [Васильев и др., 2013а; Ковалева и др., 2013а].

Прогнозируется, что данный биопрепарат будет широко востребован в лабораториях и ветеринарных службах рыбоводческих хозяйств [Викторов и др., 2012]. По сравнению с существующими методиками диагностики псевдомоноза разрабатываемая нами методика заметно сократит время исследования [Викторов, 2011], затраты на оборудование и материалы. Вместе с тем, позволит типировать возбудителя псевдомоноза до вида, что крайне важно при назначении правильного лечения. Биопрепарат для лечения псевдомоноза в сравнении с антибиотиками, во-первых, не будет иметь негативного влияния на полезную микрофлору организма и на сапрофитную микрофлору биоценоза, во-вторых, его применение не будет вызывать появление мутантных антибиотикоустойчивых форм, в-третьих, применение бактериофагов позволит получать экологически чистую, не содержащую антибиотики, продукцию из рыб [Васильев и др., 2009; Ковалева и др., 2013б; Шестаков и др., 2013].

#### Список литературы

1. Барт Н.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Бактериофаги *Providencia* // Материалы Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», Ульяновск. – 2009а. – С. 140–146.
2. Барт Н.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Биологические свойства бактериофагов *Providencia* // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования», Ульяновск. – 2009б. – С. 6–8.

3. Барт Н.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Спектр литической активности бактериофагов *Providencia* // Материалы V Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. – Т. II. – С. 12–16.

4. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Богданов И.И. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб // Естественные и технические науки. – 2011. – № 2 (52). – С. 79–82.

5. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Богданов И.И., Шестаков А.Г. Выделение и типирование бактерии *Pseudomonas putida* // Научно-теоретический журнал Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2009. – № 9 (10). – С. 58–60.

6. Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Васильева Ю.Б., Шестаков А.Г. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1 (13). – С. 59–62.

7. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В., Барт Н.Г., Богданов И.И., Васильева Ю.Б., Викторов Д.А., Золотухин Д.С., Журавская Н.П., Калдыраев А.И., Карамышева Н.Н., Ковалева Е.Н., Коритняк Б.М., Ляшенко Е.А., Молофеева Н.И., Пожарникова Е.Н., Пульчеровская Л.П., Семанина Е.Н., Феоктистова Н.А., Шестаков А.Г. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013а. – 316 с.

8. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В. Бактериофаги рода *Bacillus* // Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; НИИЦМиБ. – Ульяновск. – 2013б. – 80 с.

9. Васильева Ю.Б. Фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*: свойства и перспективы применения // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3 (23). – С. 44–49.

10. Викторов Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2011. – 22 с.

11. Викторов Д.А., Артамонов А.М., Васильев Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* // Ветеринария и кормление. – Москва: «ВЕТКОРМ». – 2012. – № 5. – С. 8–9.

12. Викторов Д.А., Гринева Т.А., Васильев Д.А., Артамонов А.М., Золотухин С.Н. Усовершенствование методов диагностики псевдомонозов рыб // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23–25 апреля 2013. – 2013. – Т. 1. – С. 162–164.

13. Гринева Т.А., Викторов Д.А., Васильев Д.А. Схема выделения *Pseudomonas chlororaphis* // Вестник ветеринарии. – Ставрополь: «Энтропос». – 2013. – № 64 (1/2013). – С. 18–20.

14. Ковалева Е.Н., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Сульдина Е.В., Имамов М.А., Швиденко И.Г. Выделение бактериофагов *Listeria monocytogenes* методом индукции // Вестник УГСХА. – 2013а. – № 1 (21) – С. 45–49.

15. Ковалева Е.Н., Сульдина Е.В., Васильев Д.А., Имамов М.А. Изучение биологических свойств бактериофагов *Listeria* // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов. – 2013б. – С. 125–127.

16. Шестаков А.Г., Молофеева Н.И., Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Семанин Е.Г. Соотношение бактериофагов в биопрепарате полифага // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы V Международной научно-практической конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – 2013. – С. 205–210.

## КОМПЛЕКСНЫЙ БИОПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ ФАГОВ INTEGRATED BIOLOGICAL PRODUCT ON THE BASIS OF PHAGES

**А.Г. Семанин, Е.И. Суркова, А.С. Скорик, Ю.Б. Васильева,  
Н.А. Феоктистова, А.Н. Пирюшова, Н.Р. Уралов  
A.G. Semanin, E.I. Surkova, A.S. Skoryk, Yu.B. Vasilieva,  
N.A. Feoktistova, A.N. Piryushova, N.R. Uralov**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** The article presents the study produced phage preparations and develop author profilaktirujut funds intestinal and respiratory diseases.

В настоящее время самыми распространенными заболеваниями являются кишечные и респираторные инфекции. Возбудители этих инфекционных болезней являются зооантропонозами. К заражению наиболее восприимчивы люди и животные с ослабленным иммунитетом, в молодом и преклонном возрасте [Барт и др., 2009а, 2009б, 2011; Викторов и др., 2012, 2013; Викторов, 2011; Васильев и др., 2011, 2013; Васильева, 2013а, 2013б; Ковалева и др., 2013а, 2013б, 2013в, 2013г, 2013д].

Для лечения и профилактики инфекций используют антисептические препараты или антибиотики, которые могут провоцировать возникновение дисбактериоза, аллергии и других осложнений. Также химиотерапевтические препараты являются экологически небезопасными, а курс лечения – зачастую дорогостоящий и малоэффективный [Васильева, 2013а].

Как известно лучшее лечение – это профилактика заболеваний.

В настоящее время отечественной биопромышленностью выпускаются фаговые препараты против конкретных заболеваний: клебсиеллезный, протейный, сальмонеллезный, колибактериозный фаги. Также имеются препараты, на основе комплексов фагов: пиофаг (для лечения и профилактики гнойных ран), фудфаг (биологическая добавка к пище), Монарда (гель-спрей на основе фагов и эфирных масел общего действия) [Васильева, 2013а, 2013б; Ковалева и др., 2013г].

Однако все эти препараты имеют ряд существенных недостатков: вы-

сокая цена, труднодоступность, одностороннее действие, сомнительная эффективность.

Как решение проблемы мы видим создание функционального продукта в виде спрея, обладающего антибактериальным, иммуномодулирующим, дезинфекционным, дезодорирующим действиями.

Распыление экоспрея сформирует облако мельчайших частиц влаги, насыщенных биоактивными веществами – фагами. Фаги находят чужеродные, потенциально опасные бактерии и существенно уменьшают их численность, одновременно осажая взвесь пыли и очищая воздух.

Мы планируем, что данный препарат может применяться: в местах массового скопления людей в период эпидемий: для профилактики респираторных и кишечных инфекций; в квартирах: для обработки любых поверхностей, предметов обихода и дезинфекции воздуха; в офисе и автомобиле: для создания благоприятного микроклимата; в местах содержания животных: для санации их организмов и санитарной обработки мест их обитания; для обеззараживания продуктов питания, обработки рук.

В коллекции музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» имеются фаги энтеробактерий, клебсиелл, морганелл, провиденсий, цитробактерий, эрвиний, энтерококков, листерий, иерсиний, бацилл, бордетелл, псевдомонад, аэромонад, флавобактерий, протей, сальмонелл, эшерихий.

Целью нашей работы явилось изучение бактерицидной активности экспериментального фагового коктейля, в отношении кишечных бактерий видов *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, родов *Salmonella*, *Morganella*.

Работу проводили на базе НИИЦМиБ. В работе использовали общепринятые в микробиологии и фагологии методы [Барт и др., 2009а, 2009б, 2011; Викторов и др., 2012, 2013; Викторов, 2011; Васильев и др., 2011, 2013; Васильева, 2013а, 2013б; Ковалева и др., 2013а, 2013б, 2013в, 2013г, 2013д].

В результате проведенных исследований установили, что экспериментальный биопрепарат в концентрации  $10^4$  корпускул в мл после 3,5 часовой экспозиции с бактериальными культурами концентрацией  $10^{10}$  микробных тел является бактерицидным для всех изучаемых штаммов бактерий *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, родов *Salmonella*, *Morganella*.

В дальнейшем мы планируем подобрать композицию фагов, которая будет обладать синергизмом и высокой активностью против возбудителей респираторных и кишечных заболеваний. В течение года будет скон-

струирован препарат на основе биологически активных компонентов, воздействующих на широко распространенных возбудителей инфекций животных и человека: бордетеллез, клебсиеллез, протейная инфекция, смешанная кишечная инфекция и др.

#### Список литературы

1. Барт Н.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Бактериофаги *Providencia* // Материалы Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», Ульяновск. – 2009а. – С. 140–146.
2. Барт Н.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Биологические свойства бактериофагов *Providencia Providencia* // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования», Ульяновск. – 2009б. – С. 6–8.
3. Барт Н.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Спектр литической активности бактериофагов *Providencia* // Материалы V Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. – Т. II. – С. 12–16.
4. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 233–235.
5. Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Васильева Ю.Б., Шестаков А.Г. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1 (13). – С. 59–62.
6. Васильева Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллезной инфекции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013а. – № 2 (22). – С. 25–29.
7. Васильева Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллеза // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013б. – № 2 (22). – С. 51–56.
8. Викторов Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 22 с.
9. Викторов Д.А., Артамонов А.М., Васильев Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* // Ветеринария и кормление. – Москва: «ВЕТКОРМ». – 2012. – № 5. – С. 8–9.
10. Викторов Д.А., Гринева Т.А., Васильев Д.А., Артамонов А.М., Золотухин С.Н. Усовершенствование методов диагностики псевдомонозов рыб // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23–25 апреля 2013. – 2013. – Т. 1. – С. 162–164.
11. Ковалева Е.Н., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Сульдина Е.В., Имамов М.А., Швиденко И.Г. Выделение бактериофагов *Listeria monocytogenes* методом индукции // Вестник УГСХА. – 2013а. – № 1 (21) – С. 45–49
12. Ковалева Е.Н., Васильев Д.А., Сульдина Е.В., Имамов М.А. Выделение и характеристика бактериофагов *Listeria monocytogenes* // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». – Ульяновск: Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013б. – Т. 2 – С. 130–133
13. Ковалева Е.Н., Сульдина Е.В., Васильев Д.А. Фагоиндикация бактерий рода *Listeria* с целью мониторинга почвенных экосистем // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: Тезисы докладов Международной конференции, Москва 4–6 февраля 2013 г. – М.: Бином. – 2013д. – С. 97.

14. Ковалева Е.Н., Сульдина Е.В., Васильев Д.А., Имамов М.А. Изучение биологических свойств бактериофагов *Listeria* // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов. – 2013в. – С. 125–127.

15. Ковалева Е.Н., Сульдина Е.В., Имамов М.А. Перспективы применения бактериофагов *Listeria monocytogenes* // Животноводство России в условиях ВТО: от фундаментальных исследований до высокопродуктивного производства: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых, 9–11 апреля 2013. – Орел: Изд-во Орел ГАУ. – 2013г. – С. 181–184.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ МОЛЕКУЛ ВИРУСА АЧС

### PROSPECTS FOR THE USE OF RECOMBINANT MOLECULES OF THE ASF VIRUS

**А.А. Щербина, А.С. Малоголовкин, Е.Н. Ковалева**  
**A.A. Shcherbina, A.S. Malogolovkin, E.N. Kovaleva**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** Work is devoted to the creation of workable ASFV recombinant molecules for their further use in the development of vaccines and test systems. When using the techniques of molecular biology in this research was created recombinant protein molecule p 60 of ASF virus.

Целью данной работы является создание генно-инженерной конструкции в бактериальном векторе и оценка функциональности данной конструкции в эукариотических клетках.

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие задачи: осуществить полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для получения ПЦР-продуктов, содержащих нуклеотидные последовательности генов p72, p17 и p60 вируса АЧС; создать генно-инженерные конструкции, экспрессирующие белки p72, p17 и p60; оптимизировать условия наращивания, выделения и очистки рекомбинантных плазмид p17, p60 и p72; оценить пригодность рекомбинантных конструкций в условиях селекции, используя трансфекцию в эукариотических клетках.

Пользуясь таким методом молекулярной биологии, как ПЦР нужно было добиться значительного увеличения малых концентраций нуклеотидных последовательностей генов вируса АЧС в биологическом материале [Балышев и др., 1999; Барышников, Шишкин, 2002; Васильева и др., 2014; Гловер, 1988; Колонцов, 1995; Копытов, 2004; Afonso et al., 1992; Vasylyeva, 2013]. Увеличение концентрации нуклеотидных последовательностей наращивали процессом амплификации. Для этого процесса следует подобрать оптимальную программу на амплификаторе. В исследовании была использована готовая смесь, так называемая Mix смесь. После брали из холодильника праймеры Forward и Reverse, в котором они хранятся при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перемешивали и осаждали на Vortex, а затем раскапывали по 1,5  $\mu\text{l}$ . В самом конце раскапывали по 2  $\mu\text{l}$  исходной ДНК.

Провели ПЦР для белков p17, p60 и p72 вируса АЧС. По окончании амплификации ставили электрофорез в 1,5% агарозном геле для определения размеров продуктов реакции. На основании размеров и расстоянии пробегов маркерных ДНК (рестрицированная HindIII и EcoRI ДНК фага лямбда) вычисляли размеры исследуемых фрагментов ДНК.

Следующим этапом предстояло провести лигирование. В молекулярной биологии, лигирование относится к соединению двух фрагментов ДНК путем образования фосфодиэфирной связи. Ферменты, известные как лигазы, катализируют реакцию лигирования. Для этого смешали все компоненты реакции и поставили на ночь на  $+4^{\circ}\text{C}$  [Балышев и др., 1999; Барышников, Шишкин, 2002; Гловер, 1988; Копытов, 2004; Колонцов, 1995; Afonso et al., 1992].

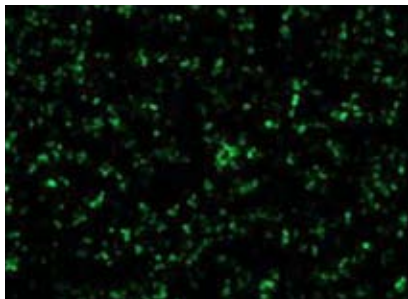
Затем требовалось, чтобы комплекс вектор+вставка вошел в бактериальную клетку *E. coli*. Под действием электрического тока, поры в клетках открываются, что позволяет войти комплексу, данная процедура называется электропорацией. После электропорации клетки посеяли шпателем на агар с Канамицином. После суток инкубирования выросшие колонии пересадили в жидкую среду SOC. В пробирках (это пробы под номерами: 1 p17, 2 p17, 3 p17, 4 p17, 1 p60, 2 p60, 3 p60, 4 p60, 2 p72), в которых среда через сутки помутнела, провели выделение плазмид коммерческим набором The Pure Link (USA) согласно инструкции.

Далее для плазмид поставили электрофорез в 1,5% геле для определения размеров продуктов реакции и обнаружения комплекса в реакции.

Проведенный электрофорез в агарозном геле выявил, что лишь в одной пробе – 3 p60 находится комплекс вектор+вставка. С этой пробой проводили дальнейшие исследования.

Последним этапом нужно было провести трансфекцию – процесс введения нуклеиновой кислоты в клетки человека и животных невирусным методом и подтвердить наше исследованием, тем, что эукариотическая клетка способна синтезировать созданную искусственно генноинженерную конструкцию белка р60 вируса АЧС. Трансфекцию проводили при помощи реагента Липофектамин-плюс (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Клетки НЕК-293 культивировали в 6-луночной планшете, в среде DMEM с 10% FBS. Для трансфекции использовали 2,5 мкг плазмидной ДНК, содержащей полноразмерную копию гена р60, и 4 мкл Липофектамина. Трансфекцию проводили в среде OptiMem в течение 12 часов. Клетки культивировали со средой DMEM с 10% FBS 24 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (SANYO CO<sub>2</sub> Incubator). Так как наша вставка имела последовательность гена, кодирующего зеленый флюоресцентный белок GFP (рис. 1), то после трансфекции под микроскопом мы наблюдали зеленые клетки. Это говорит о том, что трансфекция в эукариотических клетках прошла успешно и клетки теперь экспрессируют белок.

В ходе данного исследования была создана успешно функционирующая генно-инженерная конструкция, которая подтвердила свою работоспособность на примере трансфекции. Данная конструкция может быть использована в дальнейшем при создании тест-систем, вакцин. Использование рекомбинантных молекул является перспективным направлением, огромным преимуществом которого является экологическая и биологическая безопасность, быстрота проводимых исследований и приближается к 100% точности анализа.



**Рисунок 1.** Эукариотические клетки с комплексом вставка+вектор под флюоресцент-ным белком GFP.

#### Список литературы

1. Балышев В.М. Кнize В. А., Цыбанов С.Ж. География АЧС и типовая гетерогенность возбудителя болезни. – М.: МВА им. К.И. Скрябина. – 1999. – С. 92–94.
2. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. – М.: Эдиториал УРСС. – 2002. – 320 с.
3. Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>.

4. Гловер Д. Клонирование ДНК. Методы. – М.: Мир, 1988. – 538 с.

5. Колонцов А.А. Локализация мажорных полипептидов вируса АЧС и вирусассоциированных ферментов в структуре вирионов. – Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1995. – № 3. – С. 34–38.

6. Копытов В.О. Клонирование и экспрессия генов структурных белков р30 и р72 вируса африканской чумы свиней: дис. ... к.б.н. – Покров. – 2004. – 127 с.

7. Afonso C.L., Alcaraz C., Brun A. Characterization of р30, a highly antigenic membrane and secreted protein of african swine fever virus // Virology. –1992. – № 189 (1). – P. 368–373.

8. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 45. – № 6. – С.81–85.

## КОМБИНИРОВАННЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

### COMBINED PROBIOTIC PREPARATIONS

**В.В. Батраков<sup>1</sup>, А.Г. Шестаков<sup>2</sup>, Д.А. Васильев<sup>2</sup>**

**V.V. Batrakov<sup>1</sup>, A.G. Shestakov<sup>2</sup>, D.A. Vasilev<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE “Ulyanovsk State Pedagogical University”,  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: [vladimir.batrakov@rambler.ru](mailto:vladimir.batrakov@rambler.ru)

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE “Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A.Stolypin”,  
Russian Federation, Ulyanovsk

**Summary.** Development of the original recipe combined probiotic preparation of a number of strains of different species of bacteria.

Разработка оригинального рецепта комбинированного пробиотического препарата из ряда штаммов различных видов бактерий.

Изыскание способов воздействия и стимуляции на организм сельскохозяйственных животных с целью повышения их продуктивности всегда стояло перед прикладной наукой. Среди предлагаемых рынком средств на сегодняшний день разного рода стимулирующих кормовых добавок пробиотики выгодно отличаются от прочих препаратов.

Пробиотики представляют собой живые микроорганизмы, кото-

рые при скармливании по-разному, но благоприятно воздействуют на организм продуктивных животных. Исследования подтверждают, что применение пробиотиков может оказывать противоинфекционное, иммуномодулирующее воздействие на организм, повышать барьерные функции (физиологические механизмы, защищающие организм от воздействия окружающей среды, препятствующие проникновению в него бактерий, вирусов и вредных веществ), стимулировать моторику и экскреторную функции кишечника [Смирнова и др., 2010; Fries et al., 1982; Stephenson, Perego, 2002]. Пробиотики считаются эффективным элементом технологии производства безопасной продукции животноводства и птицеводства [Коршунов и др., 2000]. Предлагаемые рынком пробиотические препараты различаются по стоимости, составу, способам и дозам применения [Павлов и др., 2001; Ушакова и др., 2012]. Нами ранее проводились исследования по стимулированию экзополимерного матрикса у бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* [Батраков и др., 2014; Шестаков, 2011]. Подобная модель была перенесена нами на пробиотические штаммы бактерий.

Мы предприняли попытку разработать оригинальный рецепт пробиотического препарата. Консорциум препарата составляет из набора следующих видов микроорганизмов со стимулированным экзополимерным матриксом:

*Bacillus subtilis* – является продуцентом некоторых полипептидных антибиотиков, а также ферментов амилазы (крахмал) и протеазы (усвоение белковых премиксов). Стимулирует повышение усвоения корма в сравнении с ЖКТ не заселенным данным видом;

*Bacillus coagulans* – продуцент молочной кислоты; спорообразующие бактерии способные длительно циркулировать в ЖКТ; опосредованно через ЖКТ и кровеносную систему влияет на качество мясного и молочного сырья;

*Bifidobacterium animalis* – стимулируют выработку иммунитета; бактерии данного вида активны на всем протяжении ЖКТ способствуют накоплению нормофлоры во всех отделах ЖКТ;

*Weissella thailandensis* – обладает антибиотикорезистентностью и антагонистической активностью в отношении широкого спектра грам-отрицательных микроорганизмов;

*Lactococcus lactis* – продуцент бактериоцинов, антогонист патогенной микрофлоры.

*Lactobacillus acidophilus* – ацидофильные лактобактерии вызывают молочнокислое брожение и, благодаря этому своему качеству, широко используются при изготовлении молочнокислых продуктов;

*Propionibacterium freudenreichi* – имеют трофическую связь (образуют трофическую цепь) с молочнокислыми бактериями, которые предварительно сбраживают углеводы (лактозу, глюкозу, мальтозу) с образованием молочной кислоты, которую в форме лактатов *Propionibacterium freudenreichi* используют в качестве источников углерода и энергии;

*Bifidobacterium bifidum* – живые бифидобактерии обладают высокой антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов кишечника (включая стафилококки, протей, энтеропатогенную кишечную палочку, шигеллы, некоторые дрожжеподобные грибы), восстанавливают равновесие кишечной микрофлоры, нормализуют пищеварительную и защитную функции кишечника, активизируют обменные процессы, повышают неспецифическую резистентность организма;

*Enterococcus faecium* – источник молочной кислоты, профилактика антибиотико-ассоциированной диареи бактериальной этиологии.

#### Список литературы

1. Батраков В.В., Шестаков А.Г., Малинов Е.С., Васильев Д.А. Влияние L-аргинина на формирование внеклеточного полимерного матрикса бактериями *Pseudomonas aeruginosa* // Любимцевские чтения – 2014. Современные проблемы эволюции и экологии. Сборник материалов международной конференции. – 2014. – С. 267–270
2. Коршунов В.М., Володин Н.Н., Ефимов Б.А. [и др.] Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника // Микробиология. – 2000. – № 3. – С. 86–91.
3. Павлов Д.С., Егоров И.А., Некрасов Р.В., Лактионов К.С., Кравцова Л.З., Правдин В.Г., Ушакова Н.А. Использование биологически активных кормовых добавок для повышения питательных свойств комбикормов и увеличения норм ввода в комбикорма шротов и жмыхов // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2011. – № 1. – С. 89–92.
4. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбеян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 4. – С. 435–446.
5. Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Правдин В.Г., Кравцова Л.З., Бобровская О.И., Павлов Д.С. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–192.
6. Шестаков А.Г. Среда для стимуляции образования биопленок у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Научная жизнь. – 2011. – № 5. – С. 22–26.
7. Fries J.L., Murphy W.A., Sueiras-Diaz J., Coy D.H. Somatostatin antagonist analog increases GH, insulin, and glucagon release in the rat // Peptides. – 1982. – Vol. 3. – № 5. – P. 811–814.
8. Stephenson S.J., Perego M. Interaction surface of the Spo0A response regulator with the Spo0E phosphatase // Molecular Microbiology. – 2002. – Vol. 44. – № 6. – P. 1455–1467.

## СЕКЦИЯ 4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

### РЕАЛИЗАЦИЯ ПУТЕЙ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ В ПЕРВЫЙ ГОД ПОСТЭМБРИОГЕНЕЗА У РЫБ ВИДА КАРП ОБЫКНОВЕННЫЙ (*CYPRINUS CARPIO* L.)

### REALIZATION OF WAYS OF PROGRAMMABLE CELLULAR DEATH ON DIFFERENT TERMS OF POSTEMBRYOGENESIS OF CARP FISHES (*CYPRINUS CARPIO* L.)

Д.И. Омарова<sup>1,2</sup>, Е.И. Антонова<sup>3</sup>, О.З. Мкртчян<sup>1</sup>  
D.I. Omarova<sup>1,2</sup>, E.I. Antonova<sup>3</sup>, O.Z. Mkrтчян<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет»,  
Российская Федерация, Омск  
Omsk State Pedagogical University, Russian Federation, Omsk  
<sup>2</sup> E-mail: din-dinohka@mail.ru

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет  
им. И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk

**Summary.** Comparative analysis of cell death in the first year of postembryogenesis of fish revealed that I type death is dominated in the periportal zone of the liver acinus; it is confirmed by the large number of CPP-32-positive hepatocytes. In centrolobular zone the inhibition of expression occurs by the genes of proteins synthesis, but I type of death remains primary. In perivenular zone II type cell death was revealed, that is confirmed by a large number of LC3 A/B-positive hepatocytes.

**Введение.** В настоящее время большое количество работ посвящено анализу соотношения путей программируемой клеточной гибели на примере различных органов и экспериментальных моделях. На сегодняшний день выделяют такие пути программируемой гибели клеток, как: апоптоз, программированный некроз, аутофагия, апоптоз-некротические континуумы [Константинов и др., 2003; Лянгузова и др., 2000; Mizushima et al., 2004].

Апоптотическая и аутофагическая гибель клеток имеют общие молекулярные механизмы, несмотря на то, что некоторые особенности,

биохимические и морфологические характеристики их перекрываются, отражая наличие в клетках широкого спектра танатогенных подпрограмм деструкции [Желтухин, Чумаков, 2010; Киясов, 2000].

Апоптоз определяется в единичных клетках или группах клеток в ответ на какие-либо физиологические или патологические процессы. Стимулами к запуску аутофагии являются отсутствие факторов роста, питательных веществ, наличие поврежденных органелл [Galluzzi, Kroemer, 2008].

В современной литературе много работ посвящено анализу путей клеточной гибели у теплокровных животных, при этом практически не изученными остаются соотношения путей клеточной гибели гепатоцитов у холоднокровных животных [Антонова, 2009].

В связи с этим целью работы является: проанализировать соотношение путей клеточной гибели гепатоцитов у рыб вида *Cyprinus carpio* первого года постэмбриогенеза.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на 30 животных вида *Cyprinus carpio* первого года постэмбриогенеза в двух повторностях. Для изучения и анализа путей ПКГ использовали методы окраски: иммуно-гистохимии (иммунофенотипирование) и гистохимии [Киясов, 1998].

Подсчет числа и соотношения показателей ПКГ гепатоцитов проводился на площади в 0,04 мм<sup>2</sup>, в трёх зонах ацинуса на световом микроскопе AxioImager A1 с помощью программного обеспечения Axiovision rev. 4.7. (CarlZeiss).

Выявление путей ПКГ гепатоцитов проводили, используя маркеры различных программ ПКГ (табл. 1):

– выявление гепатоцитов, гибель которых реализуется по пути апоптоза (смерть клетки по типу I), осуществляли с помощью выявления антител к белкам-маркерам каспазы-3 (CPP32, 1:100, Novocastra).

– выявление гепатоцитов, гибель которых реализуется через программу аутофагии (смерть клетки по типу II), определяли с помощью выявления антител к белку-маркеру начальной стадии аутофагии – LC3A/B (1:200, Abcam).

Анализ путей регуляции программ гибели клетки осуществляли с помощью выявления антител к белкам-маркерам:

– p53 (1:80, Novocastra) – проапоптотический белок, вызывает остановку клеточного цикла и репарацию ДНК, реализует запуск программы апоптоза или индуцирует процесс аутофагии [Желтухин, Чумаков, 2010];

– bcl-2 (1:100, Novocastra) – антиапоптотический белок, маркер клеточно-

го обновления, который ингибирует реализацию ПКГ по пути апоптоза [Коган, 2008].

**Результаты и их обсуждение.** В ходе исследования было выявлено, что в перипортальной зоне происходит активация I пути гибели клеток (апоптоз). Это подтверждается тем, что количество CPP32-положительных гепатоцитов больше, чем LC3A/B-положительных гепатоцитов на 65%. При этом количество Bcl-2-положительных гепатоцитов на 52% больше, чем p53-положительных гепатоцитов (рис. 1).

Это может объясняться тем, что на ранних сроках постэмбриогенеза активность гепатоцитов I зоны характеризуется более выраженным аэробным метаболизмом, т.к. омываются кровью с наибольшим содержанием O<sub>2</sub> и питательных веществ, гормонов, первыми отвечают на регенераторные стимулы, менее дифференцированы и исполняют роль своеобразной «камбиальной» зоны печеночного ацинуса [Антонова, 2009; Желтухин, Чумаков, 2010; Galluzzi et al., 2007].

Таблица 1

**Пути клеточной гибели и регуляции танатогенных программ гепатоцитов на разных сроках постэмбриогенеза**

	Перипортальная зона	Центролобулярная зона	Перивенулярная зона	В 3-х зонах
<b>LC3A/B</b>				
1 год	3.2±0.2	3.9±0.4*	3.8±0.2	4.2±0.3
<b>Bcl-2</b>				
1 год	3.8±0.2	2.2±0.2*	4.5±0.2*	3.4±0.2
<b>p53</b>				
1 год	2.5±0.3	1.3±0.1*	3.5±0.2*	2.4±0.2
<b>CPP32</b>				
1 год	5.3±0.3	2.4±0.2*	3.3±0.1	3.4±0.2
Примечание: * - p=0,05 t-критерий Стьюдента				

Наблюдается уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптотических телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т.д. Апоптотические клетки и тельца экспонируют на поверхности сигнальные и адгезивные молекулы, которые узнаются соседними клетками или макрофагами и способствуют фагоцитозу [Лянгузова и др., 2000].

В центролобулярной зоне наблюдается снижение экспрессии генами основных белков клеточной гибели, преимущественным путем гибели является аутофагия. В частности происходит увеличение количества

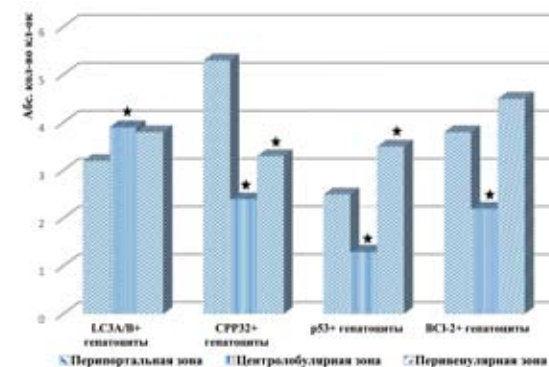
LC3A/B- и уменьшение CPP-32-положительных гепатоцитов на 27% и 25% соответственно относительно показателей перипортальной зоны ацинуса.

Реализация II пути клеточной гибели происходит на фоне увеличения количества p53-положительных гепатоцитов на 84%.

Гепатоциты центролобулярной зоны преимущественно осуществляют биотрансформацию эндогенных и экзогенных ксенобиотиков [Коган, 2008; Galluzzi, Kroemer, 2008].

В перивенулярной зоне на фоне угнетения программы апоптоза (уменьшение числа CPP32-положительных гепатоцитов) происходит увеличение LC3A/B-, p53-, bcl-2-положительных гепатоцитов в сравнении с перипортальной зоной ацинуса на 19%, 28% и 18% соответственно. Следовательно в перивенулярной зоне в большей мере реализуется гибель гепатоцитов по пути аутофагии. Так как перивенулярная зона характеризуется низким порциальным содержанием O<sub>2</sub> в крови и, следовательно, преобладанием анаэробных процессов метаболизма, что является стимулом для активации аутофагии [Антонова, 2009; Mizushima et al., 2004].

Таким образом, можно сделать заключение, что на первый год постэмбриогенеза у рыб в перипортальной зоне ацинуса выявлено наибольшее количество CPP 32-положительных гепатоцитов, что свидетельствует о реализации первого пути гибели клеток. В центролобулярной зоне наблюдается наибольшее содержание LC3A/B-положительных гепатоцитов, ведущим путем гибели является аутофагия. В перивенулярной зоне выявлено высокое содержание LC3A/B-, p53-, bcl-2-положительных гепатоцитов, преимущественным путем гибели является аутофагия.



**Рисунок 1.** Распределение LC3A/B-, CPP32-, Bcl-2-, p53-положительных гепатоцитов в условиях физиологической нормы у рыб вида *Cyprinus carpio* в трёх зонах печеночного ацинуса (примечание: \*p=0,05) на первый год постэмбриогенеза.

**Список литературы**

1. Антонова Е.И. Реактивность и пластичность тканевых компонентов печени в сравнительном ряду позвоночных в норме и после гипертермии: автореф. дисс. ... док. биол. наук: 03.00.25. – Астрахань, 2009. – 44 с.

2. Желтухин А.О., Чумаков П.М. Повседневные и индуцируемые функции гена P53 // Успехи биологической химии. – 2010. – С. 447–516.
3. Киясов А.П. Методы иммуногистохимии. Иммуногистохимическая диагностика опухолей человека // Руководство для врачей-морфологов. – Казань, 1998. – С. 9–34.
4. Киясов А.П. Современные технологии морфологических исследований. – Казань: КГМУ, 2000. – 38 с.
5. Коган Н.Ю. Роль маркеров клеточного обновления (BCI-2, KI-67) и апоптоза эпителиоцитов желудка в возникновении и прогрессировании заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori*: автореф. дисс. ... к. мед. наук: 14.00.05. – Самара, 2008. – 27 с.
6. Константинов Е.М., Крамаренко И.И., Смирнова Т.Д., Терех С.М., Тронов В.А. Роль репарации ДНК в клеточной гибели индуцированной генотоксическим действием: I съезд общества клеточной биологии // Цитология. – 2003. – Т. 45. – № 9. – С. 88–89.
7. Лянгузова М.С., Поспелов В.А., Кислякова Т.В. Дифференцированные клетки тератокарциномы мыши линии F9 вступают в апоптоз при разрыве контакта с субстратом // Цитология. – 2000. – Т. 42. – № 10. – С. 955.
8. Galluzzi L., Kroemer G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis // Cell. – 2008. – Vol. 135. – № 7. – P. 1161–1163. Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I., Zischka H., Castedo M., Zitvogel L., Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications // Cell Death and Differentiation. – 2007. – Vol. 14. – P. 1237–1243.
9. Mizushima N., Yamamoto A., Matsui M., Yoshimori T., Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker // Mol. Biol. Cell. – 2004. – Vol. 15. – № 3. – P. 1101–1111.

## РАЗРАБОТКА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

### DEVELOPMENT OF PCR FOR DETECTION OF CONTAMINATION OF CELL CULTURES

**Ш.А. Айрапетян, Е.И. Барышникова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин**  
**Sh.A. Hayrapetyan, E.I. Baryshnikov, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin**

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru*

**Summary.** Cell culture and widespread application in various fields of Experimental Biology and Medicine to study and solve the fundamental problems of public and private virology, oncology, biochemistry, biotechnology, etc. The problem of identification of cells in culture has become apparent in the 50–60s of the twentieth century, when the analysis of chromosome sets of species-specific antigens and a number of human cell lines and animals were cases of interspecies cell contamination.

Целью нашего исследования являлось выявление вирусной и микоплазменной контаминаций в клеточных культурах овечьего происхождения методом ПЦР.

Для исследования были взяты клетки СМЯ, праймеры ЛМЖ (ПО-2, ЛЭЯ, СМЯ), «Набор препаратов для выявления генома лентивирусов мелких жвачных методом полимеразной цепной реакции» (ГНУ ВНИ-ИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров); «МИК-КОМ» для выявления возбудителей микоплазмоза методом ПЦР (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва).

**Выявление контаминантов микоплазм клеточных культур.** ПЦР – амплификация: общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл. В комплекте реагентов для ПЦР-амплификации «ПЦР-комплект» применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска [Vasylyeva, 2013; Мاستиленко и др., 2014].

Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95°C, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Подготовили необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-РМИК-КОМ для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб [Васильев и др., 2014; Васильев и др., 2010; Васильев и др., 2013].

На поверхность воска внесли по 10 мкл ПЦР-смесь-2blue, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесь-1-РМИК-КОМ.

Сверху добавили по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло можно не добавлять.

**Проведение амплификации.** Взять подготовленный материал для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внесли по 10 мкл ДНК, выделенной из клинических проб или контролей этапа выделения [Васильева и др., 2013а, 2013в; Васильева, 2014].

Поставили контрольные реакции амплификации: отрицательный контроль (K–) – вместо ДНК-пробы внесли в пробирку 10 мкл ДНК-буфер, положительный контроль (K+) – 10 мкл ПКО ДНК.

Запустили на амплификаторе программу (см. табл. 1). Время амплификации составляет примерно 2 ч. 30 мин. на амплификаторе с регулированием температур по матрице и 1 ч. 40 мин. на амплификаторе с активным регулированием.

Таблица 1

## Проведение амплификации

Цикл	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке)		
	температура	время	циклы
0	95°C	пауза	
1	95°C	5 мин.	1
2	95°C	10 с	41
	61°C	10 с	
	72°C	10 с	
3	72°C	1 мин	1
4	10°C	хранение	

Образцы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре не выше минус 16°C (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска). Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле [Калдыркаев и др., 2013; Садеева и др., 2010; Феоктистова и др., 2012].

**Выводы.** При культивировании культуры клеток СМЯ в течение трёх пассажных уровней микоплазменная контаминация методом ПЦР не выявлена.

## Список литературы

1. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Семанина Е.Н., Борисова О.Ю., Золотухин С.Н., Швиденко И.Г. Бордетеллез животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики. – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2014. – 206 с.
2. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 230–232.
3. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алешкин А.В. Бактериофаги рода *Bacillus*. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; НИИЦ-МиБ. – 2013. – 80 с.
4. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013а. – № 10. – Ч. 2. – С. 334–338.
5. Васильева Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013в. – № 3 (23). – С. 46–51.
6. Васильева Ю.Б., Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>

7. Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Коллектив авторов под ред. Васильев Д.А., Золотухин С.Н. – Ульяновск, 2013. – С. 211–225.

8. Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Борисова О.Ю., Васильева Ю.Б. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25). – С. 50–54.

9. Садеева Н.Т., Меркулова Е.В., Феоктистова Н.А., Юдина М.А. Заболевания, вызываемые бактериями вида *Bacillus cereus* // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. – С. 25–30.

10. Феоктистова Н.А., Мустафин А.Х., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. Выделение бактерий вида *Bacillus subtilis* из объектов санитарного надзора // Молодежь и наука XXI века: материалы междунар. науч. практ. конф. молодых ученых. – Ульяновск, 2010. – Т. 3. – С. 72–76.

11. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 45. – № 6. – С. 81–85.

ИНДИКАЦИЯ *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*  
МЕТОДОМ ПЦРINDICATION OF *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*  
USING PCR

Т.А. Барсукова, А.П. Воротников, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев  
T.A. Barsukova, A.P. Vorotnikov, D.A. Viktorov, D.A. Vasilyev

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,

Российская Федерация, Ульяновск

FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",

Russian Federation, Ulyanovsk

E-mail: [grant-ugsha@yandex.ru](mailto:grant-ugsha@yandex.ru)

**Summary.** Present work was performed on the basis of the Laboratory of Molecular Biology, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary-Sanitary Examination of the Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin. Scheme of polymerase chain reaction for indication *Flavobacterium psychrophilum* was developed by a team of authors. During the study the parameters amplification were optimized: the temperature of primers hybridization and the number of cycles were defined.

Флавобактерии, как и другие возбудители бактериальных болезней рыб могут играть роль вторичной инфекции, поражая открытые раны и проникая в мышцы тела ослабленных и травмированных рыб [Васильев и др., 2011; Викторов и др., 2013; Куклина и др., 2013; Насибуллин и др., 2013].

Для предупреждения флавобактериоза необходимо соблюдать зоо-гигиенические требования, создавать для выращивания рыб наиболее благоприятные условия содержания и кормления, предотвращать попадание сорных рыб [Васильев и др., 2010; Васильева и др., 2013а, 2013б, 2014]. В настоящее время в России диагностика флавобактериозов рыб не осуществляется, так как не разработаны доступные диагностические средства. При обнаружении больной рыбы назначаются большие дозы антибиотиков широкого спектра действия. Однако своевременная и точная диагностика позволит рыбводам снизить количество применяемых антибиотиков и повысить тем самым экологичность продукции и рыбо-водческих прудов [Викторов и др., 2013; Куклина и др., 2013].

Наиболее прогрессивным в настоящее время методом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на выявлении специфической нуклеотидной последовательности в геноме возбудителя [Викторов и др., 2013, 2014; Мاستиленко, 2011; Мастиленко и др., 2014].

**Цель исследования** – апробация разработанной коллективом авторов схемы полимеразной цепной реакции для индикации *F. psychrophilum*.

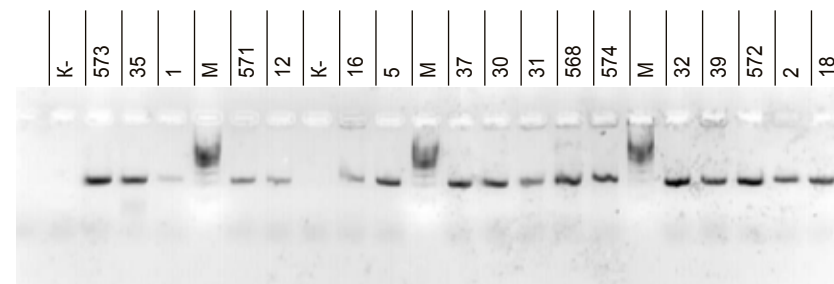
**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали культуры штаммов *F. psychrophilum* 1, 2, 5, 12, 16, 18, 30, 31, 32, 35, 37, 39, 568, 571, 572, 573, 574, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновской ГСХА им П.А. Столыпина». Для выделения ДНК использовали «ПРОБА-ГС» («ДНК-Технология», Москва). В работе были использованы олигонуклеотиды, разработанные коллективом авторов. Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР использовали камеру для горизонтального электрофореза («Helicon», Москва), источник постоянного тока ЭЛЬФ-8 (НПО «ДНК-Технология», Россия), ультрафиолетовый трансиллюминатор с длиной волны 260–280 нм («Vilbom», Франция), гель-документирующая система (Россия), трис-борат буфер, агарозный гель (2,0%) с этидиум бромидом, маркеры молекулярного веса 100–1000 («СибЭнзим», Новосибирск).

Для амплификации в работе использовали «НАБОР базовый с Taq ДНК полимеразой» («СибЭнзим», Новосибирск), амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва).

Программа амплификации:

1. Денатурация ДНК – 95°C – 5 мин. – 1 цикл; 35 циклов;
2. Денатурация ДНК – 95°C – 10 с,
3. Отжиг праймеров – 60°C – 20 с,
4. Элонгация – 72°C – 10 с,
5. Заключительная элонгация – 72°C – 2 мин. – 1 цикл.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом гельэлектрофореза [Васильев и др., 2010; Vasylyeva et al., 2013]. После проведения электрофореза выявляли ампликоны размером 224 п.о. (рис. 1).



**Рисунок 1.** Результаты гель-электрофореза продуктов амплификации. Примечание: «М» – маркеры молекулярного веса, «К-» – отрицательный контрольный образец.

**Заключение.** В результате проведенных исследований апробирована разработанная коллективом авторов схема полимеразной цепной реакции для индикации *F. psychrophilum*. В процессе работы была оптимизирована программа амплификации: 95°C – 5 мин. (1 цикл), 95°C – 10 с, 60 °C – 20 с, 72°C – 10 с (35 циклов), 72°C – 2 мин. (1 цикл). Были получены стабильные результаты ПЦР на 17 штаммах *F. psychrophilum* с детекцией продуктов амплификации размером 224 п.о. методом гель-электрофореза.

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Викторов Д.А., Богданов И.И. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб // Естественные и технические науки. – 2011. – № 2 (52). – С. 79–82.
2. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 230–232.
3. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013а. – № 10. – Ч. 2. – С. 334–338.

4. Васильева Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013б. – № 3 (23). – С. 46–51.

5. Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>

6. Викторов Д.А., Гринева Т.А., Васильев Д.А., Артамонов А.М., Золотухин С.Н. Усовершенствование методов диагностики псевдомонозов рыб // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23–25 апреля 2013. Т. 1. – Ульяновск, 2013. – С. 162–164.

7. Викторов Д.А., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Горшков И.Г., Куклина Н.Г., Насибуллин И.Р., Гринева Т.А. Мультиплексная ПЦР-система для индикации *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida* // Молекулярная диагностика: Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 2014. – Т. 2. – М.: ООО «Издательство МБА», 2014. – С. 506–507.

8. Куклина Н.Г., Горшков И.Г., Викторов Д.А., Васильев Д.А., Насибуллин И.Р. Разработка инновационных подходов решения проблем аэромоназов в рыбководстве // Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса: Материалы Международной научно-практической конференции, Курган, 25–26 апреля 2013. – Курган: Изд-во Курганской ГСХА, 2013. – С. 243–247.

9. Мاستиленко А.В. Разработка идентификации *Bordetella bronchiseptica* на основе иммунохимических и молекулярно-генетических методов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 20 с.

10. Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Борисова О.Ю., Васильева Ю.Б. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» // Научно-теоретический журнал Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25) январь–март. – С. 50–54.

11. Насибуллин И.Р., Горшков И.Г., Куклина Н.Г., Викторов Д.А., Васильев Д.А., Нафеев А.А. Применение реакции нарастания титра фага для индикации аэромонад в рыбной продукции // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23–25 апреля 2013. Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 158–161.

12. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 45. – № 6. – С. 81–85.

## ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ЧУМЫ МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ

### POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF VIRUS PLAGUE OF SMALL RUMINANTS

Е.А. Брендюк, Н.И. Сальников, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин  
Е.А. Brendyuk, N.I. Salnikov, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: [grant-ugsha@yandex.ru](mailto:grant-ugsha@yandex.ru)

**Summary.** Work is devoted to the development of a test system that detects products infected with peste des petits ruminants.

Наибольшее географическое распространение чума мелких жвачных (ЧМЖ) получила на африканском континенте и в странах Ближнего Востока и Азии. В Российской Федерации ЧМЖ не регистрировалась и по данным Минсельхоза относится к особо опасным экзотическим заболеваниям с высоким риском заноса на территорию нашей страны [Садеева и др., 2012]. Несмотря на многочисленные научно-прикладные исследования, проведенные во многих странах мира, многие аспекты эпизоотологии, мер профилактики и борьбы с этим заболеванием остаются неясными [Васильев и др., 2010], поэтому возникла потребность в тест-системе, которая бы быстро распознала геном вируса ЧМЖ в зараженной продукции [Васильев и др., 2010; Васильева, 2013а, 2013б; Васильева и др., 2014; Калдыркаев и др., 2013; Мاستиленко и др., 2014; Мустафин и др., 2010; Нафеев и др., 2014; Садеева и др., 2012; Vasylyeva, 2013]. Исходя из этого, целью нашего исследования стала разработка и усовершенствование методики выявления геномной РНК вируса чумы мелких жвачных с помощью ОТ-ПЦР в режиме «реального времени».

На первом этапе работ провели анализ доступных в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей геномов различных штаммов вируса чумы мелких жвачных. В качестве мишени для отжига праймеров была выбрана нуклеотидная последовательность гена нуклеокапсидного белка (N). Для проведения реакции обратной транскрипции и амплификации выбранного участка генома рассчитана

пара праймеров при использовании консенсусной последовательности гена N вируса чумы мелких жвачных. Первый праймер (PPRf) соответствует позициям 483–508 (5'-AGAGTTCAATATGTTTRTTAGCC-TCCAT-3'), обратный праймер (PPRr) расположен в позициях 624–603 (5'-TTCCCCARTCACTCTYCTTTGT-3'). Для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени подобран зонд технологии Taq-man, содержащий на 5'-конце излучатель флуоресценции FAM, а на 3'-конце – гаситель BHQ<sub>1</sub>. Зонд (PPRz) находится в позициях 551–576 (FAM-5'-CACCGGAYACKGCAGCTGACTCAGAA-3'-BHQ<sub>1</sub>). С. Batten, A. Banyard и др. проводили эксперимент, используя одношаговую ОТ-ПЦР, это требует меньших затрат времени и реагентов, но снижает чувствительность тест-системы. Дальнейшие эксперименты мы проводили, используя ОТ-ПЦР с отдельной стадией обратной транскрипции. Оптимизацию условий постановки ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием препаратов РНК, выделенных из культурального вирусосодержащего материала, инфицированного вирусом ЧМЖ. На этапе оптимизации по количеству праймеров ставилась ОТ-ПЦР с отдельной стадией обратной транскрипции с тремя вариантами реакционной смеси, разница состава заключалась в количестве праймеров и воды соответственно: 1,5 мкл праймеров – 8,2 мкл H<sub>2</sub>O; 1 мкл праймеров – 9,2 мкл H<sub>2</sub>O; 2 мкл праймеров – 7,2 мкл H<sub>2</sub>O

Результаты эксперимента показали, что ОТ-ПЦР с отдельной стадией обратной транскрипции проходила лучше при варианте 1, где в пробирки добавлялось по 1,5 мкл праймеров. На этапе оптимизации по количеству dNTP ОТ-ПЦР проводилась с тремя вариантами реакционной смеси (в качестве вирусной составляющей использовалась культура клеток ПС, 1 пас. из Таджикистана), различающейся количеством dNTP и воды соответственно: 0,3 мкл dNTP – 14 мкл H<sub>2</sub>O; 0,6 мкл dNTP – 13,7 мкл H<sub>2</sub>O; 0,9 мкл dNTP – 13,4 мкл H<sub>2</sub>O

По результатам эксперимента было установлено, что реакция проходит лучше в тех пробирках, где использовалась смесь, содержащая 0,3 мкл dNTP и 14 мкл H<sub>2</sub>O соответственно.

Специфичность тест-системы оценивали путем исследования препаратов РНК вирусов болезни ЧКРС, ЧМЖ, блютанга, а также препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из крови интактных овец и коз. Положительные результаты были получены только для препаратов РНК вируса ЧМЖ, что свидетельствует о специфичности разработанной тест – системы. Аналитическую чувствительность ПЦР определяли, исследуя препараты РНК, выделенные из последовательных десятикратных разведений культурального материала, содержащего вирус

ЧМЖ с титром инфекционной активности  $5 \pm 0,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$  (табл. 1). Пределом чувствительности считали максимальное разведение, при котором регистрировали положительный результат. Рассчитанное значение аналитической чувствительности метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени составило  $2,3 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ .

Таким образом, нами была разработана специфичная тест-система, позволяющая проводить дифференциальную диагностику в отношении чумы крупного рогатого скота и блютанга с высокой аналитической чувствительностью. Тест-система позволяет выявлять геном вируса ЧМЖ в пробах крови и органов от инфицированных животных, а также в инфицированных культурах клеток.

Таблица 1

Результаты исследования разведений материала, инфицированного вирусом ЧМЖ (n=10)

№ проб	Вид исследуемого материала	Титр вируса, $\lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$	Результат ОТ-ПЦР	Ct
1	Вирус ЧМЖ шт. «45G35»	$5,0 \pm 0,2$	+	20,32
2	-//-/-	$4,0 \pm 0,2$	+	26,25
3	Вирус ЧМЖ шт. «Эпизоотический»	$3,3 \pm 0,2$	+	25,21
4	-//-/-	$2,3 \pm 0,2$	+	28,91
5	-//-/-	$1,3 \pm 0,2$	-	

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 230–232.
2. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013а. – № 10. – Ч. 2. – С. 334–338.
3. Васильева Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013б. – № 3 (23). – С. 46–51.
4. Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>
5. Калдыраев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин (ред.), Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 211–225.
6. Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Борисова О.Ю., Васильева Ю.Б. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25). – С. 50–54.

7. Мустафин А.Х., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А // Выделение бактерий вида *Bacillus subtilis* из объектов санитарного надзора // Молодежь и наука XXI века: материалы междунар. науч. практ. конф. молодых ученых. – Ульяновск, 2010. – Т. 3. – С. 72–76.

8. Нафеев А.А., Пелевина Н.И., Васильева Ю.Б. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями // Дезинфекционное дело. – 2014. – № 1. – С. 39–43.

9. Садеева Н.Т., Феоктистова Н.А., Меркулова Е.В., Феоктистова Н.А. Заболевания, вызываемые бактериями вида *Bacillus cereus* // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. – С. 25–30.

10. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in mono and multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 45. – № 6. – С. 81–85.

## ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В КОМБИКОРМЕ

### THE USE OF PCR FOR THE DETECTION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN ANIMAL FEED

**М.А. Карсакова, И.Х. Газаев, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин**  
**M.A. Karsakova, I.H. Gazeaev, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin**

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk*

**Summary.** African swine fever (ASF) – distributed devastating viral disease that currently threatens the pigs all over the world. The disease belongs to the group of transboundary animal infections defined by FAO as diseases that have a significant impact on the economy, trade and food security of a significant number of countries, can easily spread from one country to another and reach epidemic proportions.

Целью исследования являлась отработка методов отбора, подготовки проб комбикорма и индикация генома вируса африканской чумы свиней с помощью гнездовой ПЦР.

В работе использовали: кровь от свиньи, экспериментально заражённой вирусом АЧС штамм «Ставрополь 2009» (инфекционный титр  $5,0 \lg \text{ГЭЕ}_{50/\text{см}^3}$ ); комбикорм для свиней, в состав которого входят: отруби

пшеничные, ячмень 2 класса, мучка ячменная, мел кормовой, жмых подсолнечный, премикс КС-1.

**Контаминация комбикорма.** Готовили навески комбикорма (5 шт.) массой 300 г каждая. Затем навески контаминировали вирусосодержащей кровью свиней в 10х разведениях по  $30 \text{ см}^3$  на каждую навеску комбикорма [Борсхениус, 1987, 1989]. Использовали вирусосодержащую кровь с различным инфекционным титром вируса. Комбикорм тщательно перемешивали для равномерного распределения крови по всей массе и оставляли высушиваться в течение 12 часов при комнатной температуре [Атражева, 1981].

**Пробоподготовка.** Для элюции вируса, в комбикорм добавляли стерильный физиологический раствор в соотношении 1:5 (вес/объем), перемешивали в течение 5–10 минут при комнатной температуре [Бурдинский, 2009; Бакулов, 1969].

Суспензию фильтровали через 8 слоев стерильной марли. Пробы однократно замораживали при температуре минус  $60^\circ\text{C}$  в течение 8 часов. После полного оттаивания при комнатной температуре пробы осветляли низкоскоростным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Полученный супернатант фильтровали с помощью прибора вакуумного фильтрования через мембранный фильтр с диаметром пор 450 мкм (ФМНЦ-0,45). Выбор диаметра мембранного фильтра был сделан на основании результатов, полученных Lucas et al. [1968] в опытах по фильтрованию крови и сыворотки через фильтры Шамберлана, Беркефельда и Зейтца с разным диаметром пор (300, 450, 500, 1000 мкм). Авторами было установлено наличие вируса в фильтрах с диаметром пор 300 и 450 мкм, и отсутствие его в фильтрах с диаметром пор 500 и 1000 мкм [Козлова, Бесхлебнов, 1980].

На следующем этапе пробоподготовки в стерильной фарфоровой чашке фильтры измельчали со стерильным стеклом; добавляли  $0,2 \text{ см}^3$  деионизированной воды и  $1,0 \text{ см}^3$  лизирующего буфера. Полученную жидкость отбирали в чистые пробирки объемом  $1,5 \text{ см}^3$ , центрифугировали при 13400 об/мин в течение 30 секунд. Супернатант использовали для выделения НК [Boom et al., 1990; Gazeaev et al., 2011].

**Постановка гнездовой ПЦР-РВ.** Постановку гнездовой ПЦР-РВ осуществляли в амплификаторе Rotor Gene 6000 (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией по применению и разработанными ранее протоколами [Gazeaev et al., 1968].

**Результаты и обсуждение.** Для постановки гнездовой полимеразной цепной реакции в реальном времени были отобраны пробы комбикорма, которые мы искусственно контаминировали, провели пробоподготовку

комбикорма, а далее проводили выделение генетического материала вируса АЧС методом нуклеосорбции [Васильев и др., 2013; Васильев и др., 2010; Васильев и др., 2014; Васильева и др., 2014].

Постановку гнездовой ПЦР-РВ осуществляли с помощью двух раундов. Первый раунд (преамплификация) состоял из подготовки реакционной смеси, в которую входил ПЦР буфер RT – 8 мкл, Primer mix – 1 мкл, ДНК полимеразы – 0,1 мкл и проводился на приборе Palm-Cycler фирмы Corbett Research при следующих температурных режимах: первый цикл – денатурация при 94°, 3 мин, затем 25 циклов (денатурация – 94°, 10 с, отжиг – 58°, 30 с и синтез при 72°, 15 с). Второй раунд с последующим учетом и интерпретацией результатов проводили по анализу кривых накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM [Газаев и др., 2010].

При постановке ПЦР-РВ на матрицах ДНК, выделенных из проб комбикорма № 1, № 2, № 3, № 4 и № 5 положительный результат регистрировали в образцах № 1, № 2 и № 3.

Значения порогового цикла, зарегистрированные при исследовании проб комбикорма № 1, 2, 3, находились в прямой зависимости от величины инфекционного титра вируса в образцах.

Таким образом, при исследовании комбикорма на наличие генома вируса АЧС с помощью гнездовой ПЦР-РВ рекомендуется включать в диагностическую схему стадию пробоподготовки данного материала, состоящую из этапов приготовления суспензии, фильтрования через марлю, замораживания-оттаивания, низкоскоростного центрифугирования и фильтрования через фильтры с диаметром пор 450 мкм. Установлено, что в подготовленных данным способом образцах комбикорма, ДНК вируса АЧС выявляли при титре от 3,0 lg ГАЕ<sub>50/см<sup>3</sup></sub> и выше с использованием гнездовой ПЦР РВ.

**Выводы.** Проведение полного цикла пробоподготовки комбикорма позволяет получить очищенный от примесей и сконцентрированный материал, который может быть использован для дальнейших исследований на наличие ДНК вируса АЧС с помощью ПЦР-РВ. При включении данной процедуры в классическую схему индикации генома вируса АЧС на основе ПЦР-РВ в образцах комбикорма искомым фрагмент ДНК можно выявлять в пробах с титром вируса не менее 3,0 lg ГАЕ<sub>50/см<sup>3</sup></sub>.

#### Список литературы

1. Атражева Т. Ветеринарно-санитарная оценка комбикормов, используемых в кормлении свиней / Пути повышения качества продуктов животноводства и их ветеринарно-санитарная оценка. – Киев, 1981. – С. 41.

2. Бакулов И.А. Африканская чума свиней. – М.: Колос. – 1969. – С. 267–290.
3. Борхсениус С.Н., Чернова О.А. Микоплазмы // Цитология. – 1987. – Т. 29. – № 6. – С. 379–390.
4. Борхсениус С.Н., Чернова О.А. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биотехнология, патогенность, диагностика. – Л.: Наука, 1989. – 156 с.
5. Бурдинский В.Г. Выявление геномов возбудителей аденоматоза и висна-маеди овец с помощью полимеразной цепной реакции: дис. ... канд. вет. наук: 03.00.06. – Покров, 2009. – 114 с.
6. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Семанина Е.Н., Борисова О.Ю., Золотухин С.Н., Швиденко И.Г. Бордетеллез животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики // Монография. – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2014. – 206 с.
7. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 230–232.
8. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алешкин А.В. Бактериофаги рода *Bacillus*. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; НИИЦМиБ. – 2013 – 80 с.
9. Васильева Ю.Б., Мастыленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>
10. Газаев И.Х., Елсукова А.А., Синдрякова И.П., Цыбанов С.Ж., Колбасов Д.В. Применение метода ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса африканской чумы свиней // Молекулярная диагностика – 2010: 7 Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. – М., 2010. – С. 83–85.
11. Козлова Д.И., Бесхлебнов В.А. Современные проблемы африканской чумы свиней. – М.: ВНИИТЭИС, 1980. – С. 15–18.
12. Boom R., Sol C. J., Salimans M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – № 3. – P. 495–503.
13. Gazev I. H., Elskova A.A., Kalabekov I.M., Tsybanov S.Zh. Detection of ASFV by nested real-time PCR // Epizon. – 2011. – P. 181.
14. Lucas A., Carnero R., Bresso M. Classification of african swine fever virus // C.R. Acad. Sci. – 1968. – Vol. 266. – № 17. – P. 1800–1801.

## ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА РАБДОВИРУСОВ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ

### PCR TO IDENTIFY GENOME RHABDOVIRIDAE SALMONIDS

**К.М. Курбанова, Ф.С. Калабекова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин**  
**K.M. Kurbanova, F.S. Kalabekova, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin**

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru*

**Summary.** The article presents a study on molecular genetic methods of identification of genome of rhabdoviridae salmonids.

В целях недопущения возникновения и распространения возможных вирусных инфекций у выращиваемых рыб необходимо проведение мониторинговых исследований рыбоводных хозяйств, и своевременная постановка диагноза [Викторов и др., 2014; Куклина и др., 2013]. Это достигается только благодаря использованию методов, основанных на полимеразной цепной реакции, которая является главным инструментом активно развивающейся сегодня молекулярной эпизоотологии вирусных инфекций рыб [Васильев и др., 2010; Васильева, 2013; Викторов и др., 2014; Куклина и др., 2013; Мاستиленко и др., 2014; Нафеев и др., 2014; Феоктистова и др., 2012; Vasylyeva, 2013].

Целью данной статьи является определение возможности заражения неконсервированной икры вирусом инфекционного некроза гемопоэтической ткани лососевых рыб. Определение заражения проводилось методом полимеразной цепной реакции.

Выделение РНК из культурального вирусосодержащего материала проводили двумя методами:

К 100 мкл вирусосодержащего, исследуемого материала приливали 500 мкл лизирующего раствора № 1. Инкубировали в течение 5 минут, при температуре 56°C. После чего добавляли 30 мкл сорбента, тщательно перемешивали, осаждали сорбент центрифугированием в течение 30 секунд при 6 тыс. об./мин. Отбирали надосадочную жидкость, к осадку добавили 500 мкл отмывочного раствора № 2. Суспендировали и инкубировали пробы при температуре 56°C в течение 5 минут.

Сорбент осаждали центрифугированием в течение 30 секунд. Отбирали надосадочную жидкость и приливали к оставшемуся осадку 600 мкл 70% спирта. Перемешивали и центрифугировали 15 секунд. Отбирали надосадочную жидкость. Осадок подсушивали при комнатной температуре в пробирках с открытой крышкой в течение 10 минут. Еще раз перемешали и центрифугировали при 13,4 тысячах об./мин. 60 секунд. После чего отбирали надосадочную жидкость и использовали для проведения ОТ-ПЦР.

Для проведения ОТ-ПЦР использовали термоциклеры «Терцик МС-2» (ДНК Технология, Москва) или PalmCycler (CorbettResearch, Австралия) и пробирки емкостью 0,5 см<sup>3</sup> и 0,2 см<sup>3</sup>.

ОТ-ПЦР для выявления РНК вируса ИНГТ проводили с предварительной денатурацией со специфическими праймерами при температуре 80°C в течение 8 минут, на поверхность водной фазы наносили 30 мкл (3 капли) минерального масла, под масло вносили очищенную РНК в объеме 6 мкл. Обратную транскрипцию проводили в течение 30 минут при температуре 45°C и 3 минуты при температуре 80°C с использованием следующих компонентов: смесь праймеров (10 pmol каждого) – 2 мкл; 5 X буфер для обратной транскрипции – 5 мкл; MMVL Revertase – 1 ед.; деионизированная вода – до 25 мкл.

Для последующей амплификации готовили следующую смесь: смесь праймеров (10 pmol каждого) – 2 мкл; dNTP (25 mmol) – 0,5 мкл; MgCl<sub>2</sub> (25 mmol) – 0,5 мкл; 5X буфер для ПЦР (AmpliSens Blue) – 5 мкл; ДНК – полимеразы (TaqPol) – 1 ед.; кДНК (исследуемая проба) – 5 мкл; деионизированная вода – до 25 мкл.

Встряхивали пробы на смесителе и осаждали капли со стенок центрифугированием в течение 2 минут.

Переносили образцы в амплификатор и проводили ПЦР при следующих режимах: 95°C – 3 минуты, 95°C – 12 секунд; 59°C – 18 секунд; 72°C – 30 секунд} 35 циклов.

В каждой серии анализов использовали контрольные образцы: ПК (культуральный вирус); ОК (деионизированная вода).

Смеси для контролей готовили как и для исследуемых образцов.

Анализ продуктов реакции осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле (1–2%) с бромистым этидием (0,001%), при силе тока 60 мА и напряжении 180 В.

Результаты реакции оценивали обнаружением специфических полос в треках с исследуемыми пробами относительно полосы в пробе с ПК. Размеры исследуемых фрагментов кДНК определяли с помощью маркера молекулярного веса. Электрофорез проводили в течение 30–40 минут,

результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в УФ свете с длиной волны 254 нм. Результаты регистрировали при помощи геледокументирующей системы BioRad.

Проведена сравнительная оценка на основе ОТ-ПЦР двумя методами выделения нуклеиновых кислот: выделение РНК проводили или по модифицированной методике Boom et al. (1990) с применением силики, либо набором для выделения нуклеиновых кислот «Рибо-преп» («Интерлабсервис», г. Москва) и на спинколонках. Очищенную РНК сразу использовали для постановки ОТ-ПЦР.

Результаты исследований показали, применение спинколонки даёт хорошие результаты, но метод довольно длительный и дорогостоящий.

Выделение РНК на основе сорбентов является достаточно эффективным, удобным и безопасным методом и позволяет проводить процедуру выделения в короткие сроки. В результате проведенных исследований установлено, что выделение и очистка РНК с помощью сорбента является наиболее эффективным, безопасным, экспрессивным методом и имеет низкую себестоимость.

Данная работа позволила нам определить возможность идентификации вируса ИНГТ с помощью ПЦР. С этой целью нами был отработан метод выделения РНК, подобраны специфические праймеры и оптимизированы условия постановки ОТ-ПЦР.

В ходе проведенной работы мы определили возможность выявления РНК из зараженной икры методом ПЦР с электрофоретической системой детекции продуктов амплификации с использованием праймеров, рассчитанных на участок L гена РНК вируса ИНГТ.

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 230–232.
2. Васильева Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3 (23). – С. 46–51.
3. Викторов Д.А., Воронников А.П., Парамонова Н.А., Васильев Д.А. Результаты изучения биохимических свойств *Flavobacterium psychrophilum* // Международный научно-исследовательский журнал = Research journal of international studies. – Екатеринбург: «Индивидуальный предприниматель Соколова Марина Владимировна», 2014. – № 2–1 (21). – С. 53–54.
4. Куклина Н.Г., Горшков И.Г., Викторов Д.А., Васильев Д.А. Изучение культуральных свойств бактерии вида *Aeromonas salmonicida* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. – Т. 2. – С. 81–83.
5. Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Борисова О.Ю., Васильева Ю.Б. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме

«Реального времени» // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25). – С. 50–54.

6. Нафеев А.А., Пелевина Н.И., Васильева Ю.Б. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями // Дезинфекционное дело. – 2014. – № 1. – С. 39–43.

7. Феоктистова Н.А., Садеева Н.Т., Меркулова Е.В. [и др.] Заболевание, вызывается бактериями вида *Bacillus cereus* // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск. – 2012. – С. 25–30.

8. Vasilyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013. – Т. 45. – № 6. – С. 81–85.

9. Boom R., Sol C. J., Salimans M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – № 3. – P. 495–503.

### ПОДБОР ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

#### SELECTION OF PRIMERS FOR THE DETECTION OF GENES OF BACTERIA OF THE SPECIES *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

**А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева, Н.А. Феоктистова,  
А.С. Скорик, Е.И. Суркова, А.Г. Семанин  
A.V. Mastilenko, Yu.B. Vasilyeva, N.A. Feoktistova,  
A.S. Skoryk, E.I. Surkova, A.G. Semanin**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск

FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** The article discusses the issue of selection of unique primers of the genes of the bacteria *Bordetella bronchiseptica*

В современной бактериологии основная роль в диагностике бордетеллеза принадлежит микробиологическим методам [Васильев и др., 2010; Васильева и др., 2013, 2014]. Несмотря на неприхотливость роста на простых и селективных средах, остаются некоторые сложности культивирования *Bordetella bronchiseptica*. Одним из простых и довольно быстрых методов лабораторной диагностики бордетеллеза является

высококчувствительная и специфичная полимеразная цепная реакция (ПЦР) [Васильев и др., 2010а, 2010б; Васильева, 2013а, 2013б, 2013в; Васильева и др., 2013, 2014; Викторов и др., 2014; Куклина и др., 2013; Мاستиленко, 2011; Мастиленко и др., 2014; Нафеев и др., Vasylyeva, 2013а, 2013б].

Целью настоящей работы была разработка специфических праймеров к ДНК *B. bronchiseptica*.

С целью выявления специфических для *B. bronchiseptica* генов была использована публикация Parkhill et al. [2003]. На основе анализа данных этой статьи были изучены гены, встречающиеся у *B. bronchiseptica* и отсутствующие у *B. pertussis* и *B. parapertussis*.

Для анализа нуклеотидного состава ДНК *Bordetella bronchiseptica* были использованы базы данных GeneBank и Afsa. Для поиска уникальных последовательностей специфического гена были использованы ресурсы GeneBank – on-line Blast.

Для подбора праймеров были использованы программы Gene Runner Version 3.05 и Primer Blast (ресурсы GeneBank).

При разработке систем праймеров были найдены два уникальных гена *bfrA* и *bfrZ* системы TonB-комплекса наружных мембранных протеинорецепторов железа и родоспецифичные гены кодирующие фермент цитохром–С–оксидазу (*ccoX*) и 16S субъединицы рибосом (*16S rRNA*).

На наиболее консервативные участки этих генов были положены праймеры, отвечающие требуемым условиям: длина праймеров должна составлять 20–32 пары нуклеотидов, температура плавления праймера – 60–70°C, размер фланкируемого праймерами участка гена – не менее 100 и не более 1000 п.о. (табл. 1).

Праймеры были выровнены программой Gene Runner Version 3.05, определены димеры, при возможном их некомплементарном связывании самими с собой или попарно.

Праймеры были синтезированы в компании «Синтол» (Москва).

Данные праймеры мы планируем использовать для проведения ПЦР с целью детекции бактерий вида *B. bronchiseptica*.

Таблица 1

Характеристика подобранных систем праймеров

Параметры	Участок гена <i>B. bronchiseptica</i>			
	<i>bfrA</i>	<i>bfrZ</i>	<i>ccoX</i>	16S rRNA
Прямой праймер (f) 5'-3'	CCTTCCAG-CACCTGGCG-GTACGAGTT-GCTCC	GGACGACCAG-GATCACATCT-TCC	GCATTGCTC-CATCCTGTTGT-GCG	CTACGGGG-GAAAGCG-GGGGA
Обратный праймер (r) 5'-3'	CCCCGTGCCG-GGGTGCCTG-GACCTGGGCG	GCTTTCCTG-GTAGTTGGCG-TAGG	GATGGGT-TATCT-GAGCGCGC	GACCGTACTC-CCCAGGCGGT
Расчетная t плавления прямого и обратного праймеров	62,0°C	62,0°C	62,0°C	62,0°C
Теоретическая специфичность	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. bronchiseptica</i> , <i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i> , <i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i> , <i>B. avium</i> , <i>B. hinzii</i> , <i>B. holmseii</i> , <i>B. trematum</i>
Длина специфического ампликона (п.о.)	528	298	168	711

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 233–235.
2. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 230–232.
3. Васильева Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллезной инфекции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 2 (22). – С. 25–29.
4. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч. 2. – С. 334–338.
5. Васильева Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3 (23). – С. 46–51.
6. Васильева Ю.Б., Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Семанин Е.Г. Биотехнологический подход в разработке метода идентификации *Bordetella bronchiseptica* // Материалы V-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения». – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. – Т. II. – С. 15–18.
7. Васильева Ю.Б., Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Шви-

денко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>.

8. Викторов Д.А., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Горшков И.Г., Куклина Н.Г., Насибуллин И.Р., Гринева Т.А. Мультиплексная ПЦР-система для индикации *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida* // Молекулярная диагностика: Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 2014. – Т. 2. – М.: ООО «Издательство МБА», 2014. – С. 506–507.

9. Куклина Н.Г., Горшков И.Г., Викторов Д.А., Васильев Д.А., Насибуллин И.Р. Разработка инновационных подходов решения проблем аэромоназов в рыбководстве // Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса: Материалы Международной научно-практической конференции, Курган, 25-26 апреля 2013. – Курган: Изд-во Курганской ГСХА, 2013. – С. 243–247.

10. Мاستиленко А.В. Разработка идентификации *Bordetella bronchiseptica* на основе иммунохимических и молекулярно-генетических методов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 20 с.

11. Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Борисова О.Ю., Васильева Ю.Б. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» // Научно-теоретический журнал Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25) январь–март. – С. 50–54.

12. Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Сверкалова Д.Г. Определение эффективности разработанных зондов в реакции ОТ–ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. III. – № 2. – С. 152.

13. Нафеев А.А., Пелевина Н.И., Васильева Ю.Б. Вопросы эпидемиолого-эпизоотологического надзора за зоонозными инфекциями // Дезинфекционное дело. – 2014. – № 1. – С. 39–43.

14. Parkhill J., Sebahia M., Preston A., Murphy L.D., Thomson N., Harris D.E., Holden M.T.G., Churcher C.M., Bentley S.D., Mungall K.L., Cerdeño-Tárraga A.M., Temple L., James K., Harris B., Quail M.A., Achtman M., Atkin R., Baker S., Basham D., Bason N., Cherevach I., Chillingworth T., Collins M., Cronin A., Davis P., Doggett J., Feltwell T., Goble A., Hamlin N., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., Leather S., Moule S., Norberczak H., O'Neil S., Ormond D., Price C., Rabinowitsch C., Rutter S., Sanders M., Saunders D., Seeger K., Sharp S., Simmonds M., Skelton J., Squares R., Squares S., Stevens K., Unwin L., Whitehead S., Barrell B.G., Maskell D.J. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* // Nature genetics. – 2003. – Vol. 35 (1). – P. 32–40.

15. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013а. – Т. 45. – № 6. – С. 81–85.

16. Vasylyeva Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013б. – Т. 43. – № 4. – С. 44–46.

## РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

## DEVELOPMENT OF A PCR PROTOCOL FOR THE DETECTION OF BACTERIA OF THE SPECIES *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

**А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева, Н.А. Феоктистова,  
А.С. Скорик, Е.И. Суркова, А.Г. Семанин  
A.V. Mastilenko, Yu.B. Vasilyeva, N.A. Feoktistova,  
A.S. Skoryk, E.I. Surkova, A.G. Semanin**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,

Российская Федерация, Ульяновск

FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",

Russian Federation, Ulyanovsk

E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** The article deals with the development of PCR methods for the detection of *Bordetella*.

В настоящее время все более широко входит в практику использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для срочной идентификации возбудителя [Васильев и др., 2010а, 2010б; Васильева, 2013а, 2013б; Васильева и др., 2014; Викторов и др., 2014; Куклина и др., 2013; Мاستиленко, 2011; Мاستиленко и др., 2013, 2014; Vasylyeva, 2013б].

Целью настоящей работы была разработка ПЦР-протокола.

Для проведения амплификации был использован детектирующий термоциклер «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология», Москва, позволяющий проводить амплификацию и флуоресцентную детекцию в режиме «реального времени».

Для ПЦР было решено использовать коммерческий набор с оптимизированной буферной системой, Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими ее активностью антителами в присутствии красителя SYBR Green I производства «Компании «Синтол» (Москва), который содержал смесь: 125 мкМ dNTP, 1,25 у Taq-ДНК-полимераза с ингибирующими ее активностью антителами (для «горячего старта»), 1,25 мМ MgCl<sub>2</sub>, а также 10х ПЦР-буфер и минеральное масло. Объем реакционной смеси без матричной

ДНК в конечном виде составлял 25 мкл. Объем пробы с матричной ДНК, вносимой в реакционную смесь, составил 5 мкл.

Культуры *Bordetella bronchiseptica* были подвергнуты этапу выделения ДНК с помощью коммерческого набора «Проба-ГС» производства ООО «ДНК-Технолгия» (Москва) с сорбентной технологией очистки.

Затем нами был проведен ряд экспериментов для оптимизации протокола ПЦР. Для процесса амплификации был использован детектирующий термоциклер «ДТ-322» производства ООО «ДНК-Технология» (Москва) с возможностью флуоресцентной детекции во время амплификации (Real-Time). Флуоресценцию дает интеркалирующий краситель SYBR Green I, который связывается в процессе амплификации в двухцепочечной ДНК (детекция по каналу Fam: тах поглощения-494 нм, тах испускания-521 нм) [Васильев и др., 2010а, 2010б; Васильева, 2013а, 2013б; Васильева и др., 2014; Викторов и др., 2014; Куклина и др., 2013; Мاستиленко, 2011; Мастиленко и др., 2013, 2014; Vasylyeva, 2013a]. Таким образом, чем больше ампликонов образуется в процессе реакции, тем сильнее сигнал флуоресценции, а это, в свою очередь, можно применить для количественной оценки исходной матричной ДНК *Bordetella bronchiseptica*. Единственный недостаток применения интеркалирующего красителя заключается в том, что флуоресцирует не только специфический ампликон, но и связавшийся с неспецифическими продуктами SYBR Green I. Поэтому для точной оценки полученных продуктов амплификации, мы применяли также метод горизонтально электрофоретической детекции в 2,3% агарозном геле.

Одновременный экспериментальный ряд содержал несколько проб, в реакционных смесях которых температура отжига праймеров снижалась с 75°C до 60° с шагом в 5°C. Сам протокол проведения амплификации состоял из трех этапов: денатурации ДНК при 95°C, отжига праймеров на денатурированной ДНК, элонгации (синтеза новой цепи с помощью фермента Taq-ДНК-полимеразы, наибольшая активность которой проявляется при 72°C). Нами был выбран классический тип протокола ПЦР без предварительных «посадочных» циклов. Для активации Taq-ДНК-полимеразы требовалась инактивация антител, ингибирующих ее действие. Таким образом, в конечном варианте он имел следующий температурно-временной режим (где «?» – температура отжига праймеров экспериментального ряда):

1.	95°C	5 минут	– 1 цикл
2.	95°C	10 с	} – 35 циклов
	?	20 с	
	72°C	20 с	
3.	72°C	2 мин	– 1 цикл

После ряда проведенных опытов нами было установлено, что оптимальной температурой отжига праймеров оказалась 60°C. При такой температуре наблюдался максимальный продукт амплификации.

Аналогично опытам по оптимизации температурного режима были проведены эксперименты по оптимизации конечной концентрации праймеров в реакционной смеси. Нами было установлено, что избыток праймеров в реакции приводил к образованию неспецифических продуктов амплификации, имеющие размер продукта, не превышающего 100 п.о. Недостаток праймеров в экспериментальном ряду приводил либо к образованию продуктов амплификации слишком большой длины (>1000–2000 п.о.), либо видимой детекции не наблюдалось вовсе. Таким образом была выявлена оптимальная концентрации праймеров в реакционной смеси – по 15 pmol PR3-1 и PR3-2.

#### Список литературы

1. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Естественные и технические науки. – 2010а. – № 5. – С. 233–235.
2. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Применение полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных // Естественные и технические науки. – 2010б. – № 5. – С. 230–232.
3. Васильева Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013а. – № 10. – Ч. 2. – С. 334–338.
4. Васильева Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013б. – № 3 (23). – С. 46–51.
5. Васильева Ю.Б., Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>
6. Викторов Д.А., Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Горшков И.Г., Куклина Н.Г., Насибуллин И.Р., Гринева Т.А. Мультиплексная ПЦР-система для индикации *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida* // Молекулярная диагностика: Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 2014. – Т. 2. – М.: ООО «Издательство МБА». – 2014. – С. 506–507.
7. Куклина Н.Г., Горшков И.Г., Викторов Д.А., Васильев Д.А., Насибуллин И.Р. Разработка инновационных подходов решения проблем аэромоназов в рыбоводстве // Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса: Материалы Международной научно-практической конференции, Курган, 25–26 апреля 2013. – Курган: Изд-во Курганской ГСХА. – 2013. – С. 243–247.
8. Мастиленко А.В. Разработка идентификации *Bordetella bronchiseptica* на основе иммунохимических и молекулярно-генетических методов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 20 с.
9. Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Сверкалова Д.Г. Определение эффективности разработанных зондов в реакции ОТ–ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. III. – № 2. – С. 152.

10. Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Борисова О.Ю., Васильева Ю.Б. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» // Научно-теоретический журнал Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25) январь–март. – С. 50–54.

11. Vasylyeva Yu.B. Identification of *Bordetella bronchiseptica* bacteria with the help of polymerase chain reaction in monoand multiplex format // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013а. – Т. 45. – № 6. – С. 81–85.

12. Vasylyeva Yu.B. Selection of the complex of microbiological tests for *Bordetella bronchiseptica* typing // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2013б. – Т. 43. – № 4. – С. 44–46.

## СЕКЦИЯ 5. ПРОБЛЕМЫ БИОРАЗНООБРАЗИЯ И ЭКОЛОГИИ

### BIODIVERSITY OF CENTRAL AMERICA AND MEXICO: RECENT TAXONOMIC ADDITIONS TO THE FAUNA OF NEPTICULOIDEA (INSECTA, LEPIDOPTERA)

J.R. Stonis<sup>1,3</sup>, A. Remeikis<sup>2</sup>, A. Diškus<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Lithuanian University of Educational Sciences,  
Studentų St.39, Vilnius LT-08106, Lithuania

<sup>2</sup> Laboratory of Entomology, Institute of Ecology, Nature Research Centre,  
Akademijos St. 2, Vilnius LT-08412, Lithuania

<sup>3</sup> E-mail: stonis@leu.lt

**Summary.** Recently twenty-two species of Nepticulidae and Opostegidae were added to fauna of Central America and Mexico, including *Stigmella nigriverticella* (Chambers) and twenty-one new species: eighteen belonging to Nepticulidae and three belonging to Opostegidae.

**Introduction.** Central America, with a hugely diverse biota, is comparatively unexplored with respect to the collection and study of Nepticulidae and Opostegidae (Insecta, Lepidoptera, Nepticuloidea) [Stonis et al., 2013a]. These families comprise the world's smallest monotrystian Microlepidoptera. It has a worldwide distribution and includes nearly 1040 described species. Their morphology and biology has been reviewed, amongst others, by Johansson et al. [1990], Puplesis, Robinson [2000] and Puplesis, Diškus [2003]. Due to the concealed mining life-style of the larvae, difficulties in rearing the adults, and minute size of the adults, Nepticulidae and Opostegidae have not been sufficiently studied in many regions. A historical review of the description of Nepticulidae and Opostegidae from the Neotropical Region is given by Puplesis, Robinson [2000], with updates by Puplesis et al. [2002], and by Davis, Stonis [2007].

Recently one new species was described from Costa Rica [Remeikis et al. 2009], eight new species new species were described or documented from Mexico [Remeikis et al., 2009; Šimkevičiūtė et al., 2009], eight new species from the highlands [Stonis et al., 2013a] and lowlands of Guatemala (Stonis et al., 2013b), two species from Belize [Stonis et al., 2013b], and two other

new species also were described from the lowland tropical forests of Yucatán (SE Mexico) [Stonis et al., 2013d], including *Stigmella maya*, a species that is among the smallest nepticulids and the smallest Lepidoptera known in the world. Only one species newly recorded in Central America was previously known from North America (*Stigmella nigriverticella* (Chambers)).

**Methods.** Collecting methods and protocols for description are outlined in Puplesis, Robinson [2000], Puplesis, Diškus [2003], and Diškus, Stonis [2012].

#### **Review of the recently described or documented new species**

##### Family Nepticulidae Stainton

1. *Stigmella maya* Remeikis et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. (Rhamnaceae). Larvae in late November and early December, adults in December. Occur in lowland coastal forest of Yucatán (SE Mexico: Quintana Roo) [Stonis et al., 2013d].

2. *Stigmella* species AG018. This new species was documented (see Šimkevičiūtė et al., 2009), but not named pending the availability of additional male material. In the original description of the species, the host-plant, *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) [Šimkevičiūtė et al., 2009], was misidentified as *Planera aquatica* J.F. Gmelin (Ulmaceae). Larvae in November, together with very numerous old and very old mines from probably September–October. The species occurs in SW Mexico (Pacific coast: Oaxaca Region, Puerto Angel and Zapolite).

3. *Stigmella racemifera* Šimkevičiūtė et Stonis, 2009. Adults in November–December. Occur in SW Mexico (Pacific coast: Oaxaca Region, Puerto Angel) [Šimkevičiūtė et al., 2009].

4. *Stigmella nigriverticella* (Chambers, 1875). Mines in leaves of *Quercus* spp., incl. *Q. crassifolia* Humb. et Bonpl. and *Q. crispipilis* Trel. (section Lobatae). Larvae in February, adults in March [Stonis et al., 2013a]. Occur in Guatemala (in montane mixed forests at elevation 1655–2500 m) and USA (from Cincinnati, Ohio and Pennsylvania to Texas).

5. *Stigmella jaguari* Remeikis et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Quercus crispipilis* Trel. (section Lobatae). Larvae in February, adults in March [Stonis et al., 2013a]. Occur in Guatemala (in montane mixed forests at 2500 m).

6. *Stigmella lauta* Diškus et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Quercus* sp. (section Lobatae). Larvae in February, adults in March [Stonis et al., 2013a]. Occur in Guatemala (in mixed montane forests at 2000 m).

7. *Stigmella sublauta* Remeikis et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Quercus crassifolia* Humb. et Bonpl. (section Lobatae). Larvae in February, adults in

March [Stonis et al., 2013a]. Occur in Guatemala (mixed montane forests at elevation 2500 m).

8. *Stigmella aurifasciata* Diškus et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Quercus* sp. (section Lobatae). Larvae in February, adults in March [Stonis et al., 2013a]. Occur in Guatemala (in mixed montane forests at elevation about 1660 m).

9. *Stigmella guatemalensis* Diškus et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Quercus* sp. (section Lobatae). Larvae in February, adults in March [Stonis et al., 2013a]. Occur in Guatemala (in mixed montane forests at elevation about 2000 m).

10. *Stigmella* species 515. This new species was documented [Stonis et al., 2013a], but not named pending the availability of additional male material. Mines in leaves of *Quercus* sp. (section Lobatae). Larvae in February, adults in March [Stonis et al., 2013a]. Occur in Guatemala (mixed montane forests at elevation about 1660 m).

11. *Acalyptis yucatani* Remeikis et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Schinus* sp. (Anacardiaceae). Larvae in late November and early December, adults in December [Stonis et al., 2013d]. Occur in the lowland coastal forest of Yucatán (SE Mexico: Quintana Roo).

12. *Acalyptis paravidua* Šimkevičiūtė et Stonis, 2008. Adults in November–December. Occur in Mexico (Pacific coast: Oaxaca Region, Puerto Angel) [Šimkevičiūtė et al., 2009].

13. *Acalyptis terrificus* Šimkevičiūtė et Stonis, 2008. Adults in November–December. Occur in Mexico (Pacific coast: Oaxaca Region, Puerto Angel) [Šimkevičiūtė et al., 2009].

14. *Acalyptis* species AG015. This new species is documented [Šimkevičiūtė et al., 2009], but not named pending the availability of additional male material. Adults in November–December. Occur in Mexico (Pacific coast: Oaxaca Region, Puerto Angel).

15. *Acalyptis* species AG016. This new species is documented [Šimkevičiūtė et al., 2009], but not named pending the availability of additional male material. Adults in November–December. Occur in Mexico (Pacific coast: Oaxaca Region, Puerto Angel).

16. *Acalyptis basicornis* Remeikis et Stonis, 2013. Adults in February. Occurs in NE Guatemala (Petén Region) [Stonis et al., 2013b].

17. *Acalyptis peteni* Diškus et Stonis, 2013. Adults in March. Occurs in NE Guatemala (Petén Dept.) [Stonis et al., 2013b].

18. *Acalyptis caribbicus* Diškus et Stonis, 2013. Mines in leaves of *Lantana involucrata* L. (Verbenaceae). Larvae in February, adults in March [Stonis et al., 2013b]. Occur in the Caribbean Archipelago (Belize).

19. *Acalyptris statuarius* Diškus et Stonis, 2013. Larvae in February, adults in March. Occur in coast region of Belize [Stonis et al., 2013b].

#### Family Opostegidae Meyrick

20. *Pseudopostega robusta* Remeikis et Stonis, 2009. Adults in March. Occur in Costa Rica (Pacific coast) [Remeikis et al., 2009].

21. *Pseudopostega mexicana* Remeikis et Stonis, 2009. Adults in November. Occur in SW Mexico (Pacific coast) [Remeikis et al., 2009].

22. *Pseudopostega latiplana* Remeikis et Stonis, 2009. Adults in November. Occur in SW Mexico (Pacific coast) [Remeikis et al., 2009].

**Discussions.** Currently the fauna of Nepticuloidea of Central America and adjacent Mexico counts 89 species. Among the most intriguing recent discoveries in the region – *Quercus* feeding species of Nepticulidae. Oaks are dominant members of a wide variety of habitats, including savannah, chaparral, premontane or montane tropical forest, oak-pine forest, and cloud forest of Central America. The *Quercus*-feeding species treated in Stonis et al. [2013] represent a significant portion of the currently known Central American fauna of Nepticulidae (for species groups associated with *Quercus* as a host-plant, see Stonis et al., 2013c). Undoubtedly the Central American fauna of Nepticuloidea is much richer than the 89 species we recorded. Observation of numerous fresh empty leaf-mines of pigmy moths allows us to presume that late December-early February is probably best time of year to find mining larvae in Guatemala, Belize and Mexico (both the mountainous or lowland areas).

#### References

1. Davis D.R., Stonis J.R. A revision of the New World plant-mining moths of the family Opostegidae (Lepidoptera: Nepticuloidea). Smithsonian contribution to Zoology, 625. – Washington D.C.: Smithsonian Institution Scholarly Press, 2007. – 212 p.
2. Diškus A., Stonis J.R. Leaf-mining insects of Lithuania. The Nepticulidae (Lepidoptera): taxonomy, chorological composition and trophic relationships. – Kaunas: Lututė Publishers, 2012. – 220 p.
3. Johansson R., Nielsen E.S., Nieuwerkerken E.J. van, Gustafsson B. The Nepticulidae and Opostegidae (Lepidoptera) of north west Europe // Fauna Entomologica Scandinavica. – 1990. – Vol. 23. – P. 1–739.
4. Puplesis R., Diškus A. The Nepticuloidea & Tischerioidea (Lepidoptera) – a global review, with strategic regional revisions. – Kaunas: Lututė Publishers, 2003. – 512 p., figs. 612.
5. Puplesis R., Robinson G.S. A review of the Central and South American Nepticulidae (Lepidoptera) with special reference to Belize // Bulletin of the Natural History Museum, London (Entomology). – 2000. – Vol. 69 (1). – P. 3–114.
6. Puplesis R., Diškus A., Robinson G.S., Onore G. A review and checklist of the Neotropical

Nepticulidae (Lepidoptera) // Bulletin of the Natural History Museum, London (Entomology). – 2002. – Vol. 71 (1). P. 59–76.

7. Remeikis A., Stonis J.R., Diškus A., Davis D.R. Contribution to the Opostegidae fauna of Central America, with an updated checklist and description of new species from Costa Rica and Mexico (Insecta: Lepidoptera) // Acta Zoologica Lituonica. – 2009. – Vol. 19 (4). – P. 278–286.

8. Stonis J.R., Diškus A., Remeikis A., Schuster J. First discovery of *Quercus* feeding Nepticulidae (Lepidoptera) in Central America // Zootaxa. – 2013a. – Vol. 3737 (1). – P. 1–23.

9. Stonis J.R., Diškus A., Remeikis A., Noreika R., Schuster J. Four new leaf-mining *Acalyptris* species from Guatemala and Belize, with new data on bionomics of *Stigmella pruinosa* (Lepidoptera: Nepticulidae) // Zootaxa. – 2013b. – Vol. 3737 (2). – P. 101–117.

10. Stonis J.R., Diškus A., Remeikis A., Navickaitė A., Rocienė A. Description of new species of oak leaf-miners (Lepidoptera: Nepticulidae), with notes on the species groups of *Stigmella* Schrank associated with *Quercus* as a host-plant // Zootaxa. – 2013c. – Vol. 3737 (3). – P. 201–222.

11. Stonis J.R., Remeikis A., Diškus A., Noreika R. New Nepticulidae species (Insecta, Lepidoptera) from the Yucatán Peninsula (SE Mexico) // Zootaxa. – 2013d. – Vol. 3609 (2). – P. 223–230.

12. Šimkevičiūtė A., Stonis J.R., Diškus A. Taxonomic checklist of Nepticulidae of Mexico, with the description of three new species from the Pacific Coast (Insecta, Lepidoptera) // Acta Zoologica Lituonica. – 2009. – Vol. 19 (4). – P. 268–277.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *NAROSOIDEUS* MATSUMURA, 1911 (INSECTA, LEPIDOPTERA, LIMACODIDAE) ФАУНЫ РОССИИ

### MOLECULAR INVESTIGATIONS OF THE MEMBERS OF THE GENUS *NAROSOIDEUS* MATSUMURA, 1911 (INSECTA, LEPIDOPTERA, LIMACODIDAE) OF THE FAUNA OF RUSSIA

**А.В. Соловьев**

**A.V. Solovyev**

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет  
им. И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск.

*Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk*

*E-mail: solovyev\_alexey@mail.ru*

**Summary.** The taxonomic status of three members of the genus *Narosoideus* Matsumura, 1911 is in the focus of the present research: *N. flavidorsalis*, *N. fuscicostalis fuscicostalis* and *N. fuscicostalis flavissima*, two of which are known from the Far East of Russia. These taxa are well discriminated using characters of coloration of adults, but they are quite similar in other morphological characters, including male genital characters. The molecular analysis was carried out using a fragment of the gene COI with a length of

658 base pairs as a molecular marker to specify the taxonomic position of the taxa. The analysis included 4 specimens identified as *N. flavidorsalis* (Staudinger, 1887), 1 specimen *N. fuscicostalis* (Fixsen, 1887), 1 specimen *N. fuscicostalis flavissima* Hering, 1933, 2 specimens *Narosoideus* sp. and 2 specimens *N. vulpina* (Wileman, 1911). As a result of the molecular analysis, the specimens of each taxon do not form clear clades and they can be regarded as infraspecific forms of *N. flavidorsalis*.

До настоящего времени для территории Дальнего Востока России традиционно приводились два таксона из рода *Narosoideus* Matsumura, 1911: *N. flavidorsalis* (Staudinger, 1887) и *N. fuscicostalis* (Fixsen, 1887) [Tschistjakov, 1995; Соловьев, 2008], которые хорошо отличаются по внешним признакам. Так, имаго *N. flavidorsalis* (Staudinger, 1887) имеет более тёмную окраску, с оранжевыми головой и грудью, а область переднего крыла между антемедиальной и постмедиальными полосами тёмная. Вид *N. fuscicostalis*, наоборот, характеризуется светлой окраской, жёлтой головой и грудью и светлой, жёлтой областью переднего крыла, располагающейся между антемедиальной и постмедиальными полосами. Оба вида неразличимы по признакам копулятивных аппаратов самцов и самок, активно применяющихся в систематике слизневидок. *N. fuscicostalis* характеризуется более северным распространением: он известен с юга Амурской области и Хабаровского края, Приморья, Кореи и Северного Китая. Таксон *N. flavidorsalis* отмечен в Приморье, Корее, Северном Китае и Японии. В ранней работе [Соловьев, 2008] в распространении этого таксона был ошибочно приведён юг Хабаровского края (посёлок Хор) из-за неверной видовой идентификации экземпляра.

Следует отметить, *N. fuscicostalis* представлен двумя подвидами – номинативным и *N. f. flavissima* Hering, 1933 (описан в качестве формы), известным из северного Китая (провинции Шаньдун и Шэньси), систематическое положение которого также нуждается в уточнении. *N. f. flavissima* характеризуется очень светлой, практически монотонной жёлтой окраской, лишь с лёгким коричневым напылением на задних крыльях.

Для подтверждения гипотезы самостоятельного статуса *N. flavidorsalis*, *N. fuscicostalis fuscicostalis* и *N. fuscicostalis flavissima* был проведён молекулярно-генетический анализ.

В анализ были включены 4 экземпляра, идентифицированные как *N. flavidorsalis*, 1 экземпляр *N. fuscicostalis*, 1 экземпляр *N. fuscicostalis flavissima*, 2 экземпляра *Narosoideus* sp. и 2 экземпляра типового вида рода *Narosoideus* – *N. vulpina* (Wileman, 1911). В качестве аутгруппы

были выбраны представители родов *Miresa* Walker, 1855 (*M. demangei* de Joannis, 1930, *M. fulgida* Wileman, 1910, *M. bracteata* Butler, 1880), *Monema* Walker, 1855 (*M. flavescens* Walker, 1855 и *M. meyi* Solovyev & Witt, 2009) и *Barabashka* Solovyev et Witt, 2009 (*B. obliqua* (Leech, 1890)). Укоренение филогенетического дерева произведено с использованием *Barabashka obliqua*. Пол, географические данные и место хранения экземпляров указаны на филогенетическом дереве (рис. 1), где CAS – коллекция автора, CVS – коллекция Виктора Васильевича Синяева (Москва), MWM – Museum Witt München (Мюнхен).

Генетическим маркером служил фрагмент гена COI длиной 658 п.н. Секвенирование было проведено Канадским центром ДНК-штрихкодирования (Университет Гуэлфа) (Canadian Centre for DNA, Barcoding, University of Guelph). Полученные последовательности нуклеотидов размещены в базе данных BOLD (Barcode of Life Data Systems, <http://www.boldsystems.org>) с номерами, представленными на филогенетическом дереве (рис. 1). Выравнивание проведено в системе BOLD. Филогенетическое дерево построено в программе Mega 6 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) (алгоритм: Minimum Evolution, модель: Maximum Composite Likelihood). Для клад найдена бутстрепподдержка (1000 итераций) (значения показаны в основании клад на рис. 1).

В результате анализа было показано, что таксоны *N. flavidorsalis*, *N. fuscicostalis fuscicostalis* и *N. fuscicostalis flavissima* не образуют чётких клад. Так, на основании молекулярно-генетических признаков экземпляр *N. fuscicostalis fuscicostalis* (номер LIMBC294-10, AS-LIMAC 269) оказывается близким экземпляру *N. flavidorsalis* (номер LIMBC451-11, WITT-LIMAC-086), и они различаются лишь одной трансверсией. Экземпляры *N. flavidorsalis* (номер LIMBC-446-11, WITT-LIMAC-081) и *N. fuscicostalis flavissima* (номер LIMBC-448-11, WITT-LIMAC-083) оказались с абсолютно идентичными нуклеотидами изучаемого маркера.

Подобные результаты молекулярно-генетического анализа дают основание полагать, что все три таксона, *N. flavidorsalis*, *N. fuscicostalis fuscicostalis* и *N. f. flavissima*, могут являться внутривидовыми формами одного вида. В пользу этой гипотезы служат факты того, что все таксоны оказываются идентичными морфологически, за исключением степени выраженности тёмного пигмента. Следует отметить, что подобные вариации в степени выраженности пигментов ранее была отмечена для близкого вида, *N. vulpina*. Вариации в окраске у этого вида послужили причиной описания 5 таксонов из Тайваня: *N. vulpina* (Wileman, 1911), *N. formosanus* Matsumura, 1911, *N. apicipennis* Matsumura, 1931, *N. vulpinus* ab. *aurisoma* Matsumura, 1927, *N. formosicola* Matsumura, 1925), которые

в настоящее время рассматриваются в качестве синонимов [Inoue, 1992; Solovyev, Witt, 2009].

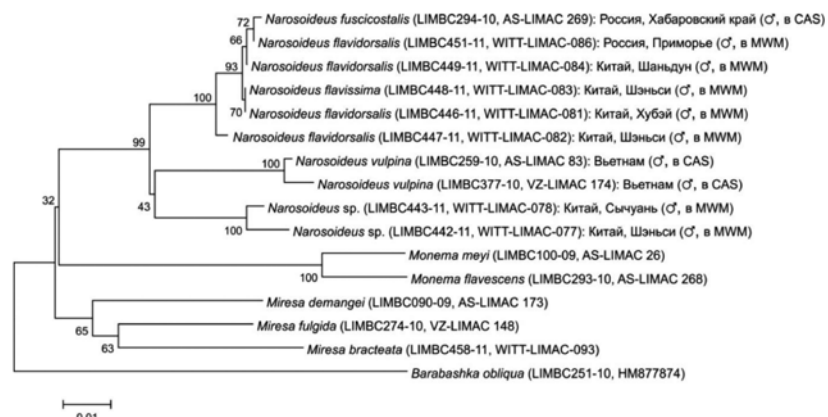


Рисунок 1. Филогенетическое дерево (описание дано в тексте).

Тем не менее, хотя ареалы *N. flavidorsalis*, *N. fuscicostalis fuscicostalis* и *N. f. flavissima* перекрываются, они не являются идентичными. В случае рассмотрения этих таксонов в качестве внутривидовых aberrаций, следовало ожидать появления всех трёх форм в каждой точке единого ареала, что в действительности не наблюдается. В этом случае слабая молекулярно-генетическая дифференциация таксонов по изучаемому маркеру может быть связана с их относительно недавним эволюционным формированием. Для подтверждения таксономического статуса всех трёх таксонов необходимо проведение дополнительного молекулярно-генетического анализа, с вовлечением как большего числа экземпляров, так и с использованием дополнительных молекулярных маркеров. Актуальным остаётся более детальное изучение биологии этих таксонов, в том числе особенностей их гусениц и анализ биотопической приуроченности.

Настоящее исследование оказалось бы невозможным без поддержки многих моих коллег. Я искренне благодарен Т. Витту и В. Шпайделю (Dr. Thomas J. Witt, Dr. Wolfgang Speidel, Мюнхен, Германия) за помощь в изучении коллекции Museum Witt (Мюнхен), М.М. Омелько (Горнотаёжная станция, Приморье) за предоставление своих сборов с территории Приморья и Хабаровского края. Я благодарен В.В. Дубатолу (Новосибирск) за ценные советы и плодотворные дискуссии. Я признателен Р. Роджери (Dr. Rodolphe Rougerie, Париж). Исследование поддержано фондом Thomas-Witt-Stiftung в 2005–2014 гг. Выполнено

при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-4188.2014.4. Молекулярный анализ выполнен на базе Канадского центра ДНК-штрихкодирования, Университет Гуэлфа, и был финансируван правительством Канады через фонд «Геном Канада» и Институт геномики Онтарио (грант 2008-OGI-ICI-03).

#### Список литературы

1. Соловьев А.В. Слизневидки (Lepidoptera: Limacodidae) России // Эверсманния. – 2008. – Вып. 15–16. – С. 17–43.
2. Inoue H. (1992). Limacodidae / Eds. J.B. Heppner, H. Inoue, Lepidoptera of Taiwan 1 – Part 2: Checklist. – Gainesville: Scientific Publishers, 1992. – P. 101–102.
3. Solovyev A.V., Witt Th.J. The Limacodidae of Vietnam // Entomofauna. – 2009. – Vol. 16, Supplement. – P. 33–229.
4. Tshistjakov Yu.A. A review of the Limacodidae (Lepidoptera) of the Russian Far East // Far Eastern Entomologist. – 1995. – № 7. – P. 1–12.

### К ПОЗНАНИЮ КОМПЛЕКСА СИДЯЧЕБРЮХИХ (HYMENOPTERA, SYMPHYTA) УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ, ТРОФИЧЕСКИ СВЯЗАННЫХ С РАСТЕНИЯМИ СЕМ. РОЗОЦВЕТНЫЕ (ROSACEAE)

#### CONTRIBUTIONS TO A STUDY OF COMPLEX OF PHYTOPHAGOUS HYMENOPTERA (HYMENOPTERA, SYMPHYTA) OF THE ULYANOVSK REGION TROFICALLY ASSOCIATED WITH PLANTS OF THE FAMILY ROSACEAE

Н.А. Ленгесова  
N.A. Lengesova

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова», Ульяновск, Российская Федерация  
Ulyanovsk State Pedagogical University named after I.N. Ulyanov  
Ulyanovsk, Russian Federation

**Summary.** There are 29 species of sawflies (Hymenoptera, Symphyta) in the Ulyanovsk region, trophically associated with plants of the Rosaceae family.

Сидячебрюхие – это подотряд перепончатокрылых насекомых, которые питаются различными растениями, единственный вид *Orussus*

*abietinus* (Scopoli, 1763) является эндопаразитом личинок златок, усачей и рогахвостов [Желоховцев, 1988]. На территории Ульяновской области установлено нахождение более 200 видов пилильщиков и рогахвостов [Ленгесова, 2004], из которых 29 видов трофически связаны с растениями семейства розоцветные (Rosaceae). Это семейство достаточно богато представлено на изучаемой территории и включает 101 вид растений, относящийся к 26 родам [Раков и др., 2014].

При изучении комплекса сидячебрюхих, трофически связанных с растениями семейства розоцветные установлено, что встреченные 29 видов входят в состав 7 семейств сидячебрюхих. Семейство Tenthredinidae в данном комплексе представлено 14 видами, Argidae – 6, Diprionidae – 4, Pamphilidae – 2, семейства Cimbicidae, Cephilidae и Siricidae имеют по 1 виду.

При изучении распространения было выявлено, что большинство видов (69%) относятся к западно-палеарктическому комплексу, то есть широко распространены в западной части Палеарктики, включая северные районы Африки, всю Европу и Кавказ. К транспалеарктическому комплексу относятся 20% видов, а 11% фауны этого комплекса – это виды западно-центрально-палеарктического комплекса, распространённые в западных и центральных районах Палеарктики, включая таежные зоны Сибири на севере и пустынные территории Средней Азии на юге. Эти данные согласуются с распространённостью кормовых растений.

Специализация питания насекомых развивается на основе химических и биологических особенностей растений, служащих им пищей. Количественно пищевая специализация может быть охарактеризована числом видов растений, используемых для питания. По пищевой специализации, характеризующей степень требовательности к пище, можно выделить следующие группы: монофаги – виды, трофически связанные с растениями одного рода, олигофаги – виды, связанные с растениями одного семейства, полифаги – виды, трофически приуроченные к растениям разных семейств или даже порядков. По собственным и литературным данным [Taeger et al., 1998] определено, что 25 видов относятся к полифагам, олигофагами являются 3 вида, один вид *Macrophya montana* (Scopoli, 1763), питающийся листьями малиной сизой или ежевики *Rubus caesius* L., 1753 – монофаг.

Из рассмотренных видов 26 являются филлофагами, тем или иным образом повреждающие листья. Карпофагами – личинками, повреждающими плоды являются 2 вида – *Hoplocampa flava* (L., 1760) и *H. testudinea* (Klug, 1916), личинки рогахвоста *Tremex magus* (Fabricius, 1787) питаются древесиной, то есть этот вид относится к ксилофагам.

Цикл развития насекомых от фазы яйца до фазы взрослой половозрелой особи называется поколением или генерацией. Из изученных представителей 29 видов имеют моновольтинный жизненный цикл, виды *Cladius pectinicornis* (Geoffroy, 1785) и *Arge pagana* (Panzer, 1797) могут иметь два и более поколений в течение года, то есть являются поливольтинными, а личинки *Tremex magus* могут развиваться 3–4 года, то есть относятся к группе с многолетней генерацией.

При изучении особенностей зимней диапаузы установлено, что 29 видов изучаемого комплекса зимуют в стадии взрослой личинки – эонимфы в верхнем слое почвы.

Некоторые виды данного комплекса на территории Ульяновской области при благоприятных условиях могут причинять существенный ущерб садоводству. Локальные вспышки численности отмечены для видов *Caliroa cerasi* (L., 1758) – вишневый слизистый пилильщик, *Hoplocampa flava* – желтый сливовый пилильщик, *Hoplocampa testudinea* – яблонный плодовой пилильщик, *Cladius pectinicornis* – земляничный гребенчатый пилильщик, *Claremontia brevicornis* (Brischke, 1883) – пилильщик земляничный; *Neurotoma nemoralis* (L., 1758) – костяноплодный пилильщик-ткач, *Arge ochropus* (Gmelin, 1790) – розанный арге обыкновенный.

#### Список литературы

1. Желоховцев А.Н. Подотряд Symphyta – сидячебрюхие // Определитель насекомых Европейской части СССР, Т. 3. Перепончатокрылые. Ч. 6. – Л.: Наука, 1988. – 268 с.
2. Ленгесова Н.А. Дополнение к фауне пилильщиков (Hymenoptera, Symphyta) Ульяновской области // Природа Симбирского Поволжья. – Ульяновск, 2004. – С. 80–83.
3. Раков Н.С., Саксонов С.В., Сенатор С.А., Васюков В.М. Сосудистые растения Ульяновской области. Флора Волжского бассейна. Т. II. – Тольятти: Кассандра, 2014. – 295 с.
4. Taeger A., Altenhofer E., Blank M., Kraus M., Pschorn-Walcher H., Ritzau C. Kommentäre zur Biologie, Verbreitung und Gefährdung der Pflanzenwespen Deutschlands / Eds. A. Taeger, S.M. Blank, Pflanzenwespen Deutschlands: (Hymenoptera, Symphyta); kommentierte Bestandsaufnahme. Deutsches entomologisches Institut. (Hrsg.). – Keltern Goecke und Evers, 1998. – P. 49–144.

## ВЛИЯНИЕ ВЫБРОСОВ ЦЕМЕНТНОГО ЗАВОДА НА РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПОКРОВ

### INFLUENCE OF CEMENT PLANT EMISSIONS ON VEGETATION

О.Е. Беззубенкова

O.E. Bezzubenkova

*ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет  
имени И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: bezzubenkova@mail.ru*

**Summary.** Through the methods of quantitative analysis of samples of soil and plants, as well as conventional methods geobotanic studied the state of vegetation in the area of cement plant emissions of Novoulyanovsk. It was found that the pollutants emitted cement plant are transformed in the atmosphere, washed out of her precipitation into the soil and accumulate, have a significant impact on the vegetation of the area. So at a distance of 500 m from the cement plant marked the smallest variety of vegetation, as compared to other areas studied.

Цементное производство отличается большим количеством выбросов как твердых, так и газообразных веществ. Это связано не только с технологическим процессом, но и с веществами, которые попадают в среду при хранении, погрузке и транспортировке продукции, оказывая значительное воздействие на состояние окружающей среды крупных городов, в частности на атмосферный воздух, поверхностные и подземные воды, почву и растительный покров [Соромотин, 2008]. В этой связи изучение изменения растительности под воздействием промышленных объектов является актуальной проблемой, представляющей как фундаментальный, так и практический интерес [Ильина, Казакова, 2012; Казакова, Ильина, 2010; Казакова и др., 2013]. Целью нашей работы явилось изучение влияния выбросов цементного завода города Новоульяновска на растительный покров.

Исследование проводилось в 2013–2014 гг. общепринятыми геоботаническими методами и методами количественного анализа проб почвы и растений, с учетом розы ветров в северо-восточном направлении на расстояниях 20 м, 500 м и 2000 м от цементного завода. Фоновые пробы

отбирались на удалении 6000 м. Для ординации видов вдоль градиента загрязнения применен метод не прямой ординации [Миркин и др., 2001].

В ходе проведенного исследования установлено, что запыленность воздуха в зоне воздействия цементного завода превышает фоновые значения на расстоянии 20 м от источника загрязнения в 3 раза, 500 м – в 1,8 раза, 2000 м – в 1,5 раза.

Осадки, вымывая загрязняющие вещества из атмосферы, попадают в верхние слои почвы, тем самым загрязняя ее. Поступая в почву в больших количествах, загрязнители в первую очередь воздействуют на биологическую составляющую почвы, снижая направленность основных микробиологических процессов [Гарицкая, Нечитайло, 2005], что в свою очередь оказывает существенное влияние на растительный покров данной территории.

Результаты химического анализа почвенных образцов показали высокую концентрацию химических элементов в почве (Pb, Cd, Cu, Zn, Ni) как в пределах санитарно-защитной зоны цементного завода, так и вне, что связано с техногенными загрязнениями территории в результате деятельности завода. По степени загрязнения почвы выделены 2 зоны: сильного и слабого загрязнения. Первая зона наиболее подверженная загрязнению – зона сильного воздействия распространяется до 500 м с превышением фоновых показателей в среднем в 5 раз. Вторая зона – зона слабого воздействия определилась от 500 м до 2000 м с превышением фоновых показателей в среднем в 2,5 раза.

Количество исследуемых элементов в почве изучаемого района не отличается большой вариабельностью и локальным увеличением, превышающих ПДК, за исключением свинца на расстоянии 500 м (в 1,5 раза выше ПДК). Наибольший коэффициент концентрации загрязняющих веществ наблюдается на расстоянии 500 м от завода, так содержание кадмия здесь выше фоновых значений в 2,5 раза, меди – в 34, цинка – в 2,9, никеля – в 1,7 раза. Кроме того суммарный показатель химического загрязнения (более 32) указывает на то, что в пределах исследуемой территории складывается чрезвычайная экологическая ситуация.

Анализ проб растений показал высокое содержание в них свинца на расстоянии 20 м (2,75 мг/кг), а кадмия, меди, цинка, никеля в зоне 500 м от цементного завода (0,29 мг/кг, 4,70 мг/кг, 7,40 мг/кг, 3 мг/кг соответственно). Значения концентрации изученных химических элементов в растениях во всех точках отбора превышали фоновые показатели.

Ординационный анализ видового состава растений вдоль оси загрязнения выявил 3 группы видов:

Группа видов сквозного распространения, присутствующих во всех

зонах загрязнения: *Sisimbrium loeselii*, *Taraxacum officinale*, *Medicago falcate*, *Arctium lappa* и др.

Группа видов сильного загрязнения, состоящая в основном из рудеральных и степных видов: *Convolvulus arvensis*, *Plantago major*, *Artemisia austriaca* и др.

Группа видов слабого загрязнения представлена видами: *Plantago media*, *Echinops ritro*, *Carex contigua* и др. произрастающими на расстоянии 2000 м от завода.

Геоботанические исследования, проводимые в зоне воздействия цементного завода, показали изменение растительности по мере удаления от завода, проявляющееся в увеличении обилия рудеральных и степных видов. При этом на расстоянии 500 м от завода отмечается наименьшее разнообразие растительности, по сравнению с другими изученными участками, что согласуется с данными химических анализов образцов почвы и растений.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что выбросы цементного завода города Новоульяновска трансформируются в атмосфере, вымываются из неё осадками, попадают в почву и накапливаются. Это делает урбанизированную территорию, прилегающую к исследуемому источнику, экологически неблагополучной и оказывает значительное влияние на растительный покров данной территории.

#### Список литературы

1. Гарицкая М.Ю., Нечитайло О.Н. Оценка экологического состояния территории, прилегающей к Самарской ТЭЦ // Вестник ОГУ. – 2005. – № 9. – С. 125–128.
2. Ильина Н.А., Казакова Н.А. Экологическая роль почвы в условиях техногенной нагрузки цементного производства // Географическая наука и образование: интеграция теории и практики: Материалы I международной заочной научно-практической конференции, под ред. Е.Ю. Анисимовой, А.И. Золотова, Н.И. Нагимовой, Н.А. Казаковой. – Ульяновск, 2012. – С. 13–17.
3. Казакова Н.А., Ильина Н.А. Особенности распределения тяжелых металлов в зоне влияния цементного производства // В мире научных открытий. – 2010. – № 4 (10). – Ч. 10. – С. 60–61.
4. Казакова Н.А., Ильина Н.А., Масленников А.В. Состояние флоры и сосудистых растений в зависимости от влияния выбросов цементного завода г. Новоульяновска // Молодой учёный. – 2013. – № 11(58). – С. 238–421.
5. Миркин Б.М., Наумова Л.Г., Соломещ А.И. Современная наука о растительности. – М.: Логос, 2001. – 264 с.
6. Соромотин В.А. Влияние выбросов цементного завода на растительный покров Центральной Якутии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Якутск, 2008. – 21 с.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАЕЗДНИКА *MINOTETRASTICHUS FRONTALIS* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EULOPHID WASP *MINOTETRASTICHUS FRONTALIS* (HYMENOPTERA: EULOPHIDAE)

А.В. Мищенко<sup>1</sup>, Д.А. Куприянова  
A.V. Mishchenko<sup>1</sup>, D.A. Kupriyanova

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет  
имени И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk  
<sup>1</sup>E-mail: a.misch@mail.ru

**Summary.** The article presents new data on molecular characterization *Minotetrastichus frontalis*: sequenced fragment of the nuclear gene 28S ribosomal RNA, the possibility of its use for the identification of species are given.

Вид *Minotetrastichus frontalis* (Nees, 1834) принадлежит к группе хальцидоидных наездников семейства эвлофид (Hymenoptera, Eulophidae); его развитие изучалось нами в условиях Среднего Поволжья на скрытоживущих насекомых-фитофагах (минёрах, галлообразователях), личинки которых развиваются в растительных тканях и образуют повреждения и ходы различной формы, часто нанося существенный урон кормовым растениям (в том числе культурным) [Мищенко, 2011].

В ходе исследований, проведённых ранее, были изучены биология и экология наездника *M. frontalis*, морфологические особенности его личиночных стадий (являющихся собственно паразитическими) [Мищенко, 2012]. Известно, что опубликованные определительные таблицы в основном содержат ключи для идентификации наездников-эвлофид по имаго [Тряпицын, 1978; Graham, 1959]; определение хозяйственно значимых видов эвлофид по личинкам связано с затруднениями ввиду морфологической схожести последних и отсутствия чётких разделительных признаков. Тем не менее, очень часто при выведении наездников из минёров в лабораторных условиях не всегда удаётся довести личинок до стадии имаго; поэтому определение видовой принадлежности эвлофид на преимагинальных стадиях на основе анализа последовательностей

ДНК является вполне обоснованным. Целью данной работы являлось проведение молекулярно-генетического исследования *M. frontalis* и получение последовательности участка ядерного гена, который может быть использован для типирования вида.

Материал для исследования был собран в лиственном лесу близ г. Ульяновска (54°16'N, 48°20'E) в июне 2014 г. В ходе полевых исследований проведены сборы листовых мин с развивающимися на хозяине наездниками в количестве 100 экз. В лабораторных условиях создавались условия для выживания и развития *M. frontalis* путём сохранения минированных листьев при постоянной температуре в термостате и увлажнении во избежание увядания. Всего было выведено 22 экз. имаго наездника указанного вида, которые определялись по ключам [Тряпицын, 1978; Graham, 1959]. Достоверно идентифицированные особи подсаживались в пластиковые контейнеры с хозяином-минёром (липовая моль-пестрянка, *Phyllonorycter issikii*) для последующего заражения и получения личинок наездника (из расчёта 1 самка наездника на 10 гусениц). Личинки *M. frontalis* фиксировались в 96% спирте и сохранялись для генетического анализа.

Экстракция ДНК проводилась с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Образцы гомогенизировались пластиковыми пестиками в пробирках типа Эппендорф на 1.5 мл и помещались для инкубации в литический раствор (Lysis Solution, Thermo Scientific), содержащий протеиназу К. Далее проводилось выделение нуклеиновых кислот на силиконовых колонках. В качестве генетического маркера использован фрагмент гена 28S рибосомальной РНК, при этом использованы следующие праймеры: ACCCGCTGAATTAAAGCATAT (прямой) и TTGGTCCGTGTTTCAAG-ACGG (обратный) [Gumovsky, 2011]. Для полимеразной цепной реакции использован следующий состав реакционной смеси (на 20 мкл): буфер (1X), праймеры (по 0.5 мкМ каждого), dNTP (250 мкМ), taq-полимераза (10 ед.), ДНК-матрица (1 мкл), деионизированная вода (до финального объёма). Амплификация проводилась с использованием термоциклера qTOWER 2.2 (Analytik Jena) при следующих температурных параметрах: денатурация ДНК – 95°C, 2 мин.; 30 циклов при условиях: денатурация ДНК – 95°C, 30 сек., отжиг праймеров – 55°C, 30 сек., элонгация – 72°C, 40 сек.; достройка цепей – 72°C, 3 мин. Оценку результатов реакции и разделение фрагментов проводили в 1% аналитическом агарозном геле (рис. 1), после чего готовился препаративный гель, из которого проводили выделение и очистку интересующего фрагмента (при помощи набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific)).

Очищенные продукты амплификации секвенировались с использованием капиллярного генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Life Technologies) (с предварительным проведением сиквенсовой реакции с флюоресцентно-мечеными дезоксирибонуклеотидами и последующей очисткой набора терминированных фрагментов).

В результате исследований получена последовательность участка гена 28S рибосомальной РНК наездника *M. frontalis* длиной 316 п.о.:

```
AGAAGCTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGTACGTGAAACCGTTTCAG
GGGTAACCTGAGAAACCCAAAAGATCGAATGGGGAGATTCATCG
TCAGCGGTGTTGGCTTCCGTGCGGCTCGCGATGGCCGGACTTCGG
TCTCGCGTCACGCGGTCGCCGCGCATGCCCGGCATCGTCGGCGTG
CACTTCTCCCCTAGTAGGACGTCGCGACCCGTTGGGTGTCGGATCA
ATGGCCGGTCGGTCGTCTGTTGCGCCTCGGCGCGGCAGACCGATCG
GTCCGTCGTCCGGCTGCCCGCGGTATAGAACGCTTAATCACGG
```

Фрагмент проанализирован и скорректирован при помощи программы Sequence Scanner 2 software (Life Technologies Corporation) [<http://www.lifetechnologies.com>] (рис. 2); полученную последовательность гена 28S рибосомальной РНК сравнивали с имеющимися в GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>].

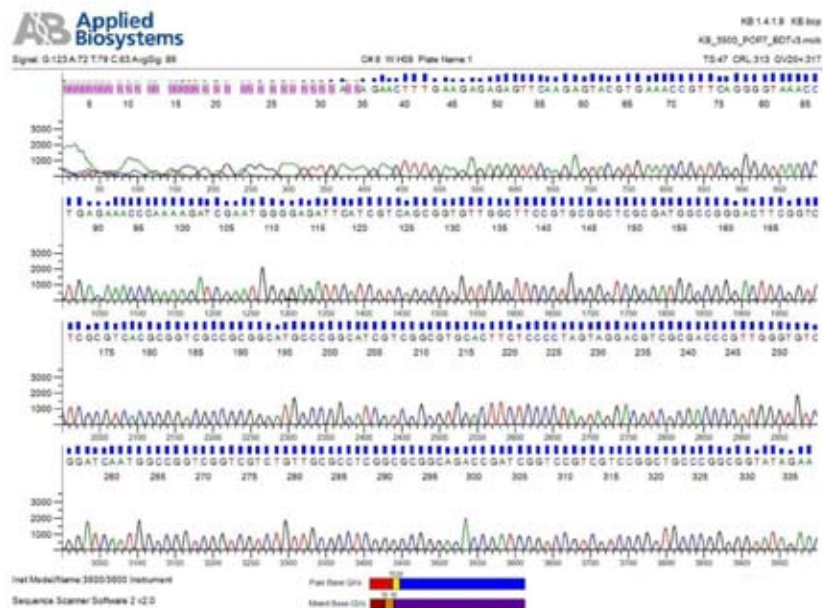
В итоге, отсеквенированный нами участок показал 100% совпадение по нуклеотидному составу с имеющимся в базе данных фрагментом с accession number AF477604 [Lopez-Vaamonde et al., 2005]. Последовательность также принадлежит изученному нами виду наездника *M. frontalis*, что подтвердило возможность видовой идентификации этого энтомофага на основе выбранного маркера. Следует отметить также, что определённая нами последовательность гена 28S рибосомальной РНК совпала только на 97% с фрагментами видов того же подсемейства эвлофид (Tetrastichinae): *Aprostocetus luteus* (accession number AY580329.1) и *A. anopliphorae* (accession number AY580327.1).

В настоящее время всё большую значимость в идентификации биологических видов,



**Рисунок 1.** Результаты аналитического агарозного геле-электрофореза ПЦР-продукта, содержащего амплифицированный фрагмент гена 28S рибосомальной РНК наездника *M. frontalis* (фото выполнено с помощью геле-документирующей системы BioDocAnalyze (Analytik Jena). Обозначения: L – длина маркера, Mkr – фрагменты ДНК-маркера, M.fr – фрагмент гена 28S рибосомальной РНК, N – отрицательный контроль.

их генетическом типировании, систематике и филогении приобретает молекулярно-генетический анализ последовательностей определённых генов. Исследование ДНК позволяет с высокой степенью достоверности различать виды-двойники, определять насекомых на разных стадиях развития, пересматривать систематическое положение хозяйственно значимых членистоногих и по-новому рассматривать их филогенетические связи. В данной статье предпринята попытка определения видовой принадлежности важного с точки зрения биологического контроля вредителей наездника *M. frontalis* на основе фрагмента ядерного гена. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования хозяйственно значимых видов энтомофагов и фитофагов позволят создать для нашего региона генетическую базу данных, доступную для широкого круга исследователей-энтомологов и специалистов по защите растений; что позволит в дальнейшем проводить достоверную идентификацию различных видов насекомых-вредителей и подавляющих их численность паразитических и хищных членистоногих.



**Рисунок 2.** Фрагмент хроматограммы гена 28S рибосомальной РНК наездника *M. frontalis* (получена с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500 и программы Sequence Scanner 2).

## Список литературы

1. Мищенко А.В. Энтомофауна листовых мин // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2011. – Вып. 5 (107). – С. 101–106.
2. Мищенко А.В. Особенности преимагинального развития наездника *Minotetrastichus frontalis* (Nees) (Hymenoptera, Eulophidae) // Энтомологическое обозрение. – 2012. – Т. 91. – Вып. 1. – С. 58–62.
3. Тряпицын В.А. Надсемейство Chalcidoidea // Определитель насекомых Европейской части СССР. – 1978. – Л.: Наука. – Т.3. – Ч. 2. – С. 28–538.
4. GenBank – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.
5. Graham M.W.R. de V. Keys to the British genera and species of Elachertinae, Eulophinae, Entedontinae and Euderinae (Hymenoptera, Chalcidoidea) // Transactions of the Society for British Entomology. – 1959. – Vol. 13. – P. 169–204.
6. Gumovsky A.V. Molecular data support the existence of four main lineages in the phylogeny of Eulophidae (Hymenoptera) // Russian Entomological Journal. – 2011. – Vol. 20. – № 3. – P. 273–286.
7. Life Technologies Corporation. URL: <http://www.lifetechnologies.com> (дата обращения: 01.12.14).
8. Lopez-Vaamonde C., Godfray H.C.J., West S.A., Hansson C., Cook J.M. The evolution of host use and unusual reproductive strategies in *Achrysocharoides* parasitoid wasps // Journal of Evolutionary Biology. – 2005. – № 18. – P. 1029–1041.

## АДВЕНТИВНЫЕ ВИДЫ ФЛОРЫ БАСЕЙНА РЕКИ СВЯГИ И СПОСОБЫ ИХ ДИССЕМИНАЦИИ

### THE ADVENTIVE SPECIES OF THE FLORA OF THE SVIYAGA RIVER BASIN AND THEIR DISSEMINATION

Д.А. Фролов  
D.A. Frolov

ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный педагогический университет  
имени И.Н. Ульянова, Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: [frilka-daniil@yandex.ru](mailto:frilka-daniil@yandex.ru)

**Summary.** The article presents an original information about adventive plants of the Sviyaga river-basin, provides an analysis of adventive fraction flora. The article describes actual methods of dissemination of the alien plants of the Sviyaga river-basin and analyzes types of their life strategies.

Территория бассейна реки Свяги расположена в лесостепной зоне лесостепной провинции центральной части Приволжской возвышенности и относится к бассейну Волги [Растительность Европейской части

СССР, 1980]. На изученной территории, как и на большей части бассейна Средней Волги, естественная растительность заменена производной антропогенной. Важнейшее значение имело сведение лесов и развитие сельского хозяйства.

Для определения антропогенной трансформации флоры бассейна р. Свияги подробно анализировалась адвентивная фракция. К адвентивной фракции относится 341 вид, принадлежащий к 216 родам и 64 семействам. Во флоре бассейна доля адвентивных видов составила 25,7%, то есть около четверти всей природной флоры, что свидетельствует о биологическом загрязнении территории.

Анализ адвентивной фракции по времени заноса показал, что основная часть заносных видов проникли на изученную территорию за последние 100 лет (число *кенофитов* составляет 70,0% от адвентивной фракции). Это связано с расширением транспортной сети, интенсификацией товарооборота, активной урбанизацией и, как следствие, увеличением площади антропоценозов, являющихся благоприятным плацдармом для внедрения адвентивных видов в биоту.

Анализ по способу заноса выявил незначительное преобладание в адвентивной флоре бассейна реки Свияги непреднамеренно занесенных видов – *кенофитов*. На их долю приходится 48,0% от общего видового богатства адвентивной фракции. Преднамеренно занесенные виды составляют 42,3% флоры адвентиков. Со временем, у многих из них наметилась тенденция к дичанию, с последующим вхождением в состав природных сообществ. Виды с промежуточным типом заноса (*кено-эргазиофиты*) составляют небольшую часть изученной флоры (33 вида; 9,7%; 2,5%).

В современной адвентивной флоре бассейна реки Свияги преобладают в той или иной степени способные к натурализации виды, образующие её стабильный компонент. К ним относятся *эпектофиты* (139 видов; 40,2%), *агриоэпектофиты* (31; 9,2%) и *агриофиты* (14; 4,2%), суммарно представленные 184 видами, преимущественно *кенофитами*, что составляет 53,7% всей адвентивной фракции. Нестабильный компонент адвентивной фракции флоры образуют *эфемерофиты* (91; 27%) и *колонофиты* (66; 19,4%), суммарно представленные 157 видами, что составляет 47% всей адвентивной флоры.

Основная часть видов адвентивной фракции флоры проникла на исследованную территорию за последние 100 лет в связи с расширением транспортной сети, интенсификацией товарооборота, активной урбанизацией. Адвентивные виды заняли преимущественно нарушенные местообитания, но, несмотря на это, являются постоянным элементом флоры.

В качестве одного из критериев оценки адаптации флоры к антропогенному влиянию предлагается использование способа распространения диаспор [Бурда, 1998]. Для характеристики способов диссеминации адвентивных видов нами применялась классификация, предложенная Р.Е. Левиной [Левина, 1987].

Результаты анализа способов диссеминации указывают на явное преобладание диплохории – 138 видов (40,6%). Совместно с полихорией (39 видов, 11,5%) эти два способа диссеминации характерны для более половины (52,1%) всех адвентивных видов. Как отмечает Р.Е. Левина [1987], дипло- и полихория – явление очень разнородное и сложное, может реализовываться различно в зависимости от условий обитания. Разнообразные варианты сочетаний способов распространения плодов и семян позволяют адвентивным видам использовать различные агенты расселения и увеличить эффективность распространения, заняв разнообразные экологические ниши. Большинство дипло- и полихорных видов является гетерокарпными. Генеративная гетерокарпия выражается в формировании на одной особи или даже в пределах одного плода диаспор, имеющих различные структурные приспособления, которые обуславливают разные способы их диссеминации. Как правило, одни из них – аллохорные, обеспечивают расселение вида и расширение его ареала, другие – ателехорные – возобновление вида рядом с материнским растением, то есть на уже освоенной территории. Обычно аллохорные диаспоры характеризуются неглубоким покоем и прорастают вскоре после попадания в почву. Ателехорные диаспоры, напротив, имеют глубокий покой, прорастают постепенно на протяжении нескольких лет, формируя сложную в генетическом отношении структуру популяции. В этом по существу и заключается огромное биологическое значение гетерокарпии. Особо следует отметить, что дипло- и полихория характерна половине из 15 видов агриофитов, внедрившихся в естественные сообщества на территории бассейна р. Свияги. К ним относятся такие виды, как *Berberis vulgaris* L., *Echinocystis lobata* (Michx.) Torr. et Gray., *Elaeagnus angustifolia* L., *Elodea canadensis* Michx. Внедрение агрессивных адвентивных видов в растительные сообщества может привести к ингибированию восстановительных сукцессий и исчезновению преимущественно доминирующих экосистем [Шварц и др. 1993], а также обеднению биоразнообразия региона.

По реке Свияге и ее притокам, в поймах и открытым склонам берегов широкое распространения получили *Bidens frondosa*, *Salix fragilis* и *Epilobium ciliatum*. У этих видов одним из агентов расселения является вода. Для увеличения эффективности расселения гидрохория сочетается

с анемохорией (*Salix fragilis* и *Epilobium ciliatum*) и эпизоохорией (*Bidens frondosa*), что помогает этим чужеродным видам успешно конкурировать с местными прибрежно-водными видами, вытесняя последние из их естественной среды обитания.

Таким образом, предположительно, что для подобных видов виолентов сочетание различных способов диссеминации (дипло- и полихория), обусловленных гетерокарпией, приводит к успешному расселению и доминированию на новых территориях.

Связи между животными и плодами растений относятся к числу древнейших, многообразных и устойчивых консортивных связей, сложившихся в биоценозах. Зоохория охватывает все без исключения наземные фитоценозы, свойственна множеству древесно-кустарниковых и травянистых растений, обеспечивает постепенное и регулярное расселение вида в пределах или по периферии его ареала, но в некоторых случаях может способствовать очень далекой миграции. Эндозоохория широко распространена среди адвентивных видов флоры бассейна р. Свияги (50 видов, 14,7%). К ним относятся представители семейства *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Grossulariaceae* и др. Большинство растений данных семейств являются «беглецами из культуры». Плоды и семена таких видов переносятся птицами или мелкими животными и расселяются по близлежащим фитоценозам, причем вблизи населенных пунктов, где наблюдается нарушенность естественных сообществ, количество таких видов увеличивается.

Эндозоохорные виды на территории бассейна р. Свияги распространены крайне неравномерно и не способны доминировать и вытеснять природные виды из их естественных фитоценозов. Для них характерна стратегия эксплорентов (шакалов растительного мира), которые имеют низкую конкурентную мощь, но продуцируя большое количество семян способны быстро захватывать освобождающуюся территорию. Они не могут долгое время удерживать территорию за собой и вытесняются силовиками. Эти растения постоянно кочуют по нарушенным участкам.

Эпизоохория и синзоохория встречается в сочетании с другими способами распространения диаспор: эпизоохория совместно с аге-стохорией (*Lappula patula*), с мирмекохорией (*Cynoglossum officinale*), с гидрохорией (*Bidens frondosa*) и анемохорией (*Hordeum jubatum*), что дает таким видам больше возможностей для расселения. Практически все эти виды имеют гетероморфные зачатки. Растения этих групп относятся к эпекофитам и агрофитам, что свидетельствует об успешно выбранной стратегии видов.

По массовости распространения диаспор анемохория является самым эффективным способом диссеминации. Среди адвентивных видов число анемохоров велико – 43 вида (12,7%), а в сочетании с другими способами диссеминации – 102 вида (30%). Среди анемохоров парящие диаспоры известны у таких растений, как *Sonchus arvensis*, *Lactuca serriola*, *Senecio vulgaris* и т.д. Плоды и семена с перистыми парашютами свойственны многим сорным видам. Планирующие плоды и семена преобладают у древесных видов – *Acer negundo*, *Fraxinus pensylvanica*, *Ulmus pumila*. Их семена снабжены крыловидными придатками, которые увеличивают дальность распространения. Особое положение занимает группа анемо-геохоров (первольвентов), куда относятся *Sisymbrium altissimum*, *Lepidium ruderales* и *Salsola tragus*. Как отмечает Р.Е. Левина [1957], диаспоры и жизненные формы у видов перекасти-поле связаны с процессом диссеминации.

Анемохоры отличаются очень высокой плодовитостью и рано или поздно все полноценные диаспоры, производимые особью, полностью разносятся ветром. Дальность расселения при этом может достигать многих километров. Гетерокарпия существенно расширяет адаптивные возможности этих видов, так как разнотипные семена различаются по дальности диссеминации. Анемохория надежно обеспечивает заселение адвентивных видов на всех благоприятных территориях.

Анемохория представлена преимущественно у видов агрофитов и эпекофитов, которые образуют стабильное ядро адвентивной флоры бассейна р. Свияги. Для видов этой группы характерные и различные жизненные стратегии – от виолентов (агрофиты) до эксплорентов (эпекофиты).

Автохория представлена 2 типами – автомеханохорией и барохорией. Барохория – это специализированный способ диссеминации, направленный на сохранение диаспор на месте произрастания. Барохория широко распространена у сорно-полевых растений, для которых характерны высокая плодовитость, значительная долговечность семян и растянутый период прорастания. Среди адвентивных видов бассейна р. Свияги барохория отмечена у 46 видов (13,5%), среди которых *Cannabis ruderalis*, *Bunias orientalis*, *Elymus sibiricus*, *Echinochloa crusgalli* и т.д. Многие представители барохоры являются однолетниками, у которых рассеивание семян является основой сохранения, развития и распространения вида. Неоднородные зачатки разноплодных видов, характерные для представителей этой группы, имеют существенные различия в темпах прорастания и продолжительности покоя, что обеспечивает длительную сохранность на занимаемой ими территории. В основном это виды

эпикофиты, натурализующиеся во флоре, но при этом расселяющиеся только по антропогенно нарушенным местообитаниям.

Автомеханохория свойственна представителям родов *Viola*, *Melilotus*, *Geranium*, *Impatiens*, но часто сочетается с мирмекохорией, эндозоохорией, агестохорией, что позволяет видам увеличить дальность расселения и занять новые территории.

По эффективности баллистохория относится к способам массовой диссеминации на близкие расстояния. Основная масса диаспор рассеивается в радиусе, равном высоте растения, и только единичные из них преодолевают расстояние вдвое больше. Баллисты встречаются во многих семействах от *Ranunculaceae* и до *Asteraceae*: *Consolida regalis*, *Dracocephalum thymiflorum*, *Hyoscyamus niger*, *Papaver orientale*, *Chaenorhinum minus* и многие другие. Баллисты преобладают в открытых травянистых ценозах. По степени натурализации среди баллистов доминируют эфемерофиты и колонофиты.

Автохория и баллистохория обуславливает жизненную стратегию видов, позволяя им лишь закрепиться на новых местообитаниях во вторичном ареале. Растения этих групп являются пациентами и эксплерентами.

Таким образом, реализация разных типов адаптивных жизненных стратегий адвентивных видов позволяет им успешно конкурировать с местными видами и расселяться во вторичных ареалах. Осуществление эффективного расселения вида обеспечивает многообразие способов диссеминации и гетерокарпия, которая повышает приспособительные возможности адвентивных видов, что позволяет им занять определенную нишу как в естественных, так и нарушенных сообществах на изучаемой территории.

#### Список литературы

1. Бурда Р.И. Критерии адаптации региональной флоры к антропогенному влиянию // Материалы IV рабочего совещания по сравнительной флористике. «Изучение биологического разнообразия методами сравнительной флористики». – СПб., 1998. – С. 260–272.
2. Левина Р.Е. Способы распространения плодов и семян. – М., 1957. – 358 с.
3. Левина Р.Е. Морфология и экология плодов. – Л.: Наука, 1987. – 160 с.
4. Раменский Л.Г. Избранные работы. – Л.: Наука, 1971. – 334 с.
5. Растительность Европейской части СССР / Ред. С.А. Грибова, Т.И. Исаченко, Е.М. Лавренко. – Л.: Наука, 1980. – 429 с.
6. Шварц Е.А., Белоновская Е.А., Второв И.П., Морозова О.В. Интродуцированные виды и концепция биоценоотического кризисов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, № 4. – С. 387–400.

## ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ *SERRATIA MARCESCEN*

### DETECTION OF THE BACTERIA *SERRATIA MARCESCEN*

И.С. Галушко, Е.О. Ефрейторова, Л.П. Пульчеровская  
I.S. Halushko, E.O. Efreitorova, L.P. Pulcherovskaya

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** Work is devoted to research on the indication and identification of the bacterium *Serratia marcescens* in water of open reservoirs.

Целью наших исследований явилось проведение индикации и идентификации бактерий вида *Serratia marcescens* в воде открытых водоемов (озера, пруды).

Исследования проводили бактериологическим методом. Используемые питательные среды: мясопептонный бульон, мясопептонный агар, среда КОДА, среды Эндо, Плоскирева и Левина, среды Гиса, лабораторные животные. Термостат ТС-80М-2, бактерицидная лампа, весы лабораторные, автоклав, сушильный шкаф, микроскоп МБИ-3, колбы емкостью 250 и 500 см<sup>3</sup>; пипетки мерные на 1,0 см<sup>3</sup>; чашки Петри, пробирки, стандарт мутности, набор красок по методу Грама. Материалом для исследования послужила водопроводная вода. Всего было отобрано 7 проб воды из озер и прудов [Беркли и др., 1997; Васильев и др., 2010, 2013, 2014; Васильева, 2010; Васильева и др., 2014; Горшкова, Бахаровская, 2014; Гринева и др., 2013; Здоровый образ жизни, 2008; Золотухин и др., 2000; Медицинская микробиология, 2013; Молофеева, Васильев, 1997; Пульчеровская и др., 2011].

Для бактериологического исследования пробы отбирали в стерильные флаконы объемом 500 мл.

В первой серии опытов при индикации бактерий вида *Serratia marcescens* использовали общеупотребительские среды, индикаторные и селективные среды для энтеробактерий [Горшкова, Бахаровская, 2014]. Посев проводили на среды КОДА, МПА, Эндо, Плоскирева и Левина.

Через 18–20 ч инкубации учитывали изменения в комбинированной среде, изучали морфологию микроорганизмов, тинкториальные свой-

ства, чистоту культуры и образование пигмента, который появлялся на свету через сутки или практически с ростом культуры. Изучали культуральные свойства бактерий на жидких и плотных средах и отсеивали подозрительные колонии на МПБ с целью получения чистых культур микроорганизмов.

На МПА искомые бактерии образовывали круглые ровные плоско-выпуклые гладкие S-колонии диаметром 1–2 мм; на селективных средах Эндо, Левина и Плоскирева – прозрачные бесцветные и цвета среды колонии диаметром 2 мм, напоминающие колонии сальмонелл. При комнатной температуре через 18–24–48 ч колонии серратий становились красными.

Идентификацию искомым микроорганизмов проводили на основании изучения биологических свойств, для этого пересеивали выделенные культуры на минимальный дифференцирующий ряд. Выделенные культуры серратий издавала ароматный запах, напоминающий запах карамели.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1  
Биологические свойства выделенного штамма бактерий *Serratia marcescens*

№ п/п	Тест	<i>Serratia marcescens</i>
1.	Ацетоин	+
2.	Мочевина	-
3.	Желатина	+
4.	Малонат	-
5.	Образование к-ты из α-метил –D-глюкозида	-
6.	Дезоксирибонуклеаза	+
7.	Липаза (кукурузное масло)	(+)
8.	D-глюкоза, образование к-ты в присутствии иодацетата, 0,001 М	+
9.	реакция Форгеса-Проснауэра	+
	Образование к-ты из	
10.	Сахарозы	+
11.	d-сорбитола	+
12.	Раффинозы	-
13.	L-арабинозы	-
14.	Каталаза	+
15.	Пигмент	+
16.	Подвижность	+
17.	Патогенность	+

**Заключение.** В результате проведенных микробиологических исследований воды с целью индикации и идентификации *Serratia marcescens* были выделены два штамма бактерий.

Выделенные нами штаммы бактерий *Serratia marcescens* были патогенными для белых мышей, а, следовательно, имеют клиническое значение и будет использован для дальнейших исследований.

#### Список литературы

1. Беркли Р., Бок Э., Бун Д. Определитель бактерий Берджи: В 2-х т. / Пер. 9-го амер. изд. Т. 2. Под ред Хоуолта Дж. и др. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
2. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Семанина Е.Н., Борисова О.Ю., Золотухин С.Н., Швиденко И.Г. Бордетеллез животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики. – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2014. – 206 с.
3. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В., Барт Н.Г., Богданов И.И., Васильева Ю.Б., Викторов Д.А., Золотухин Д.С., Журавская Н.П., Калдыркаев А.И., Карамышева Н.Н., Ковалева Е.Н., Коритняк Б.М., Ляшенко Е.А., Молофеева Н.И., Пожарникова Е.Н., Пульчеровская Л.П., Семанина Е.Н., Феоктистова Н.А., Шестаков А.Г. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – 316 с
4. Васильев Д.А., Ковалева Е.Н., Золотухин С.Н. Листерииозные бактериофаги. – Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2013–66 с.
5. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5. – С. 233–235.
6. Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В. Бактериофаги рода *Vacillus*. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; НИИЦ-МиБ, 2013. – 80 с.
7. Васильева Ю.Б. Особенности биологии бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. URL: <http://www.science-education.ru/110-9927>.
8. Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>
9. Горшкова Д., Бахаровская Е.О. Биологические свойства бактерий рода *Serratia* / Материалы IV-й Всерос. студенческой научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии». Часть вторая. – Ульяновск. – 2014. – С. 67–70.
10. Гринева Т.А., Викторов Д.А., Васильев Д.А. Схема выделения *Pseudomonas chlororaphis* // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 64 (1/2013). – С. 18–20.
11. Здоровый образ жизни [Электронный ресурс]. – 2008. – URL: <http://detibolevut.ru/>
12. Золотухин С.Н., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А. Бактерии рода *Citrobacter* и их бактериофаги // Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Сборник научных трудов. – Ульяновск, 2000. – С. 53–58.
13. Медицинская микробиология [Электронный ресурс] – Электрон. текстовые дан., 2013. URL: <http://microbjournal.ru>
14. Молофеева Н.И., Васильев Д.А. К вопросу о роли бактерий рода *Serratia* в патогенезе желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных // Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Сборник научных трудов. – Ульяновск, 1998. – С. 15–18.
15. Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Кузнецова О.В., Бахаровская Е.О. Роль бактерий

рода *Serratia* при производстве и сохранности пищевой продукции // Материалы Международной научно-практической конференции. «Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения» – Т. 1. – Ульяновск, 2011. – С. 146–149.

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ СРЕДСТВАМ БАКТЕРИЙ ВИДА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

### SENSITIVITY TO ANTIMICROBIAL AGENTS OF BACTERIA *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

А.А. Ломакин, А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева  
А.А. Lomakin., A.V. Mastilenko, Yu.B. Vasilyeva

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin",  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: grant-ugsha@yandex.ru

**Summary.** Work is devoted to mainstreaming bordetelleznoy infection at the moment and the problem of choice of antimicrobials as a selective component in the development of differential diagnostic and selective media for display and identification of *Bordetella bronchiseptica*.

Исследование чувствительности к антибактериальным препаратам является важным как в отношении разработки селективных и дифференциально-диагностических сред, так и в отношении видового и штаммового типирования выделенных бактериальных культур [Никульшина и др., 2007]. Поэтому результаты проведенных исследований могут быть положены в основу разработки схемы типирования *B. bronchiseptica* [Пульчеровская и др., 2009; Васильев и др., 2008, 2009, 2010, 2011, 2013, 2014; Васильева, 2013; Васильева и др., 2014а, 2014б; Гринева и др., 2013; Мاستиленко и др., 2014; Никульшина и др., 2007, 2008; Райчинец и др., 2014; Сверкалова и др., 2008].

Целью данной работы являлось исследование чувствительности к антибактериальным препаратам культур *B. bronchiseptica*.

В работе были использованы 9 культур *B. bronchiseptica* из коллекции музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА (№ 1, 7, 101,

157, 163, 207, 214, 22067, 8344) которые в соответствии с паспортными данными, обладали типичными для бактерий этих видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

В работе использовали ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ п. Оболенск, ТУ 9398-020-78095326-2006, Рег. № ФСР 2007/00001), ГРМ-бульон (ГНЦ ПМБ п. Оболенск, ТУ 9398-021-78095326-2006, Рег. № ФСР 2007/00002), диски с антибиотиками (НИИ им. Пастера г. Санкт-Петербург). На всех этапах работы был использован 0,9% р-р NaCl.

Была использована 6-часовая бульонная культура *B. bronchiseptica*, после инкубации в ГРМ-бульоне при 37°C. Для определения чувствительности к антибактериальным препаратам был использован диско-диффузионный метод (ДДМ), согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Бульонные культуры в количестве 1,0 мл были перенесены на чашки с плотной питательной средой и равномерно распределены на поверхности агара. После 15 минут инкубации при комнатной температуре на поверхность среды с культурой *B. bronchiseptica* в асептических условиях были помещены диски с антибактериальными препаратами. Условия культивирования посевов были следующими – 24 часа при 37°C.

После окончания инкубации чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете) (см. рис. 1, 2). Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм.

В результате проведенных исследований нами обнаружена множественная резистентность *B. bronchiseptica* к β-лактамным пенициллинам (за исключением карбенициллина), макролидам, линкозамидам. В то же время все исследуемые культуры *B. bronchiseptica* проявляют высокую чувствительность в отношении β-лактамных цефалоспоринов (за исключением цефоперазона), аминогликозидов, фторхинолонов. Диаметр зон задержки роста для β-лактамных цефалоспоринов составляет в среднем 17,5 мм (от 10 до 25 мм), для аминогликозидов – 17,5 мм (от 12 до 23 мм), для фторхинолонов – 18,5 мм (от 15 до 22 мм). Согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» величина диаметров зон задержки роста, при которых принято считать, что бактериальная культура чувствительна к антибактериальным препаратам составляет для β-лактамных цефалоспоринов ≥ 18,0 мм, для аминогликозида канамицина ≥ 18,0 мм, для аминогликозида гентамицина ≥ 15,0 мм.

## Список литературы

1. Васильев Д.А., Сверкалова Д.Г., Никульшина Ю.Б., Мاستиленко А.В. К вопросу о бактериологической диагностике бордетеллеза // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции, 20–22 мая, 2008. – Ульяновск. – 2008. – С. 92–94.
2. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Никульшина Ю.Б. Разработка методики выявления специфического участка ДНК *Bordetella bronchiseptica* с помощью ПЦР в режиме «реального времени» // Современный мир, природа и человек: Сборник научных трудов. – Томск, 2009. – С. 115–117.
3. Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Васильева Ю.Б. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Естественные и технические науки. – 2010. – № 5 (49). – С. 233–235.
4. Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Васильева Ю.Б., Шестаков А.Г. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 1 (13). – С. 59–62.
5. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Семанина Е.Н., Семанин Е.Г. Индикация *Bordetella bronchiseptica* из объектов внешней среды и клинических образцов // Материалы V-й Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения». – Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. – Т. II. – С. 18–22.
6. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Семанина Е.Н., Борисова О.Ю., Золотухин С.Н., Швиденко И.Г. Бордетеллез животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики // Монография. – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2014. – 206 с.
7. Васильева Ю.Б. Особенности биологии бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4. – С. 285. URL: <http://www.science-education.ru/110-9927>.
8. Васильева Ю.Б., Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Семанин А.Г. Основы подбора компонентов питательных сред для первичного выделения *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014а. – № 1 (25). – С. 85–92.
9. Васильева Ю.Б., Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Бадаев Р.Р., Мерчина С.В., Швиденко И.Г., Скорик А.С. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2014б. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14770>.
10. Гринева Т.А., Викторов Д.А., Васильев Д.А. Определение антибиотикочувствительности *Pseudomonas chlorogaphis* / Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции, Ульяновск, 11 июня 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 31–33.
11. Мастиленко А.В., Васильев Д.А., Борисова О.Ю., Васильева Ю.Б. Разработка системы дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «Реального времени» // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25). – С. 50–54.
12. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Хлынов Д.Н. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах / Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования». – Т. IV – Ульяновск: УГСХА, 2008. – С. 57–59.
13. Никульшина Ю.Б., Сверкалова Д.Г., Никулина Е.Н. Разработка методов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, выделенных от домашних животных // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4 (23). – С. 103–106.
14. Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Власов Н.А. Антибиотики // Учебно-

методический комплекс. Методические указания к выполнению лабораторно-практических занятий. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, 2009. – Т. 2. – 58 с.

15. Райчинец Ю.А., Феоктистова Н.А., Лыдина М.А., Бадаев Р.Р., Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Мерчина С.В., Швиденко И.Г. Методика выделения *Paenibacillus larvae* / Ю.А. Райчинец, // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 5. URL: <http://www.science-education.ru/119-14787>.

16. Сверкалова Д.Г., Мастиленко А.В., Хлынов Д.Н., Никульшина Ю.Б., Васильев Д.А. Создание транспортной и накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica* // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции, 20–22 мая, 2008. – Ульяновск. – 2008. – С. 134–136.

## ОХРАНЯЕМЫЕ ВИДЫ РЫБ РЕКИ БОЛЬШОЙ ЧЕРЕМШАН (В ЕГО СРЕДНЕМ И НИЖНЕМ ТЕЧЕНИИ) В ПРЕДЕЛАХ УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

### PROTECTED FISH SPECIES OF THE BOLSHOY CHEREMSHAN RIVER (IN ITS MIDDLE AND LOWER FLOWS) WITHIN THE ULYANOVSK REGION

**В.А. Михеев**

**V.A. Mikheev**

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет  
имени И. Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University named after I.N. Ulyanov  
Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: karaha@mail.ru

**Summary.** Data on rare fish of the Bolshoy Cheremshan River within the Ulyanovsk Region are given. Original research as well as literature data shows a presence of 5 species from The Red Data Book of the Region. One more species is recommended to be included in the new edition of the Book. Widely distributed populations of *Alburnoides bipunctatus rossicus* and *Squalius cephalus* with rather higher number are found the most welfare whereas scanty populations of *Chondrostoma variable* and *Phoxinus phoxinus* are limited there by define ecological conditions.

Краснокнижные виды – это виды, которые охраняются на определённой территории из-за их уязвимости к каким-либо факторам среды. Чаще всего основным лимитирующим фактором для рыб становится антропо-

генное влияние. Большинство краснокнижных видов рыб – это типичные реофилы, которым жизненно необходима быстротекущая вода. Подобные условия в настоящее время становятся редкостью, поскольку большинство рек имеют замедленный сток из-за создания на них многочисленных плотин. Одной из рек с относительно не изменённым гидрологическим режимом в Ульяновской области является Большая Черемшан.

Река Большой Черемшан – крупнейшая река в левобережном За-волжье Ульяновской области. Её протяжённость составляет 336 км, в пределах области – 65 км, а площадь водосборного бассейна охватывает 11,5 тыс. км<sup>2</sup>.

До недавнего времени изучение ихтиофауны бассейна р. Б. Черемшан проводилось нерегулярно отдельными исследователями, в отличие от некоторых других малых рек. В частности, можно отметить исследования ихтиофауны Б. Черемшана в его среднем течении сотрудниками кафедры зоологии Ульяновского государственного педагогического университета в 1992 году [Назаренко, Арефьев, 1997]. Новый этап изучения рыбного населения характеризуется более глубокими исследованиями среднего течения Большого Черемшана [Михеев, 2006], среднего и нижнего течения [Котельников, Семёнов, 2012].

Целью работы было изучение современного состояния популяций краснокнижных видов рыб в реке Большой Черемшан в пределах Ульяновской области.

Исследования проводили в среднем течении р. Б. Черемшан в районе с. Старая Бесовка с 12 по 22 июня 2011 года.

Рыбу вылавливали мальковой волокушей (длина 6 м, ячея в кутке 2,5 мм), ставными сетями с размером ячеи 14–35 мм и крючковой снастью.

В месте исследования река извилистая, быстрая, ширина составляет 30–35 м, средняя глубина 1,6 м, максимальная – до 2,8 м. Грунт песчаный, закоряженный. Левый берег реки пологий, правый берег – обрывистый, имеет оползневую структуру.

По результатам наших исследований и анализа литературных источников в реке Большой Черемшан в пределах Ульяновской области выявлено обитание 5 видов рыб, занесённых в Красную книгу Ульяновской области: русской быстрянки, голавля, волжского подуста, обыкновенного голяна, ельца и 1 вида-кандидата в новую редакцию Красной книги Ульяновской области, которая планируется к выпуску в 2015 году – белопёрого пескаря.

### **Русская быстрянка**

Статус: категория 2. Сокращается численность. Вид включён в

Красную книгу Российской Федерации [2001], как подвид, численность которого резко сокращается.

В реке Большой Черемшан является массовым, широко распространённым видом. Встречается совместно с уклейкой, держится ближе к поверхности воды. В уловах мелкочейистой волокушей в районе с. Старая Бесовка доля быстрянки составила 3,92% от общего количества рыб.

Средняя длина выловленных особей (24 экз.) без хвостового плавника (ad)  $5,8 \pm 0,13$  см, длина варьировала от 5 до 7,2 см. Масса проанализированных рыб колебалась от 1,5 до 6 г и в среднем составила  $3,1 \pm 0,28$  г.

### **Голавль**

Статус: категория 3. Редкий вид, имеющий малую численность на определённой территории.

Фоновый вид, обитающий на всём протяжении реки в пределах области [Котельников, Семёнов, 2012; Михеев, 2007; Назаренко, Арефьев, 1997]. По данным В.А. Назаренко [Назаренко, Арефьев, 1997] в осенних сетных уловах 1992 года в районе о/л Юность доля голавля составила 11,36% от общей численности. В наших уловах мелкочейистыми сетями 2011 года (диаметр ячеи 14–30 мм) его количественная доля составила 15,3%, в уловах мальковой волокушей – 1,38%.

Длина голавля колебалась от 4,5 до 17,5 см, и в среднем  $13,16 \pm 1,88$  см. Масса проанализированных рыб (6 экз.) варьировала от 4 до 90 г и в среднем составила  $42,5 \pm 11,38$  г.

### **Обыкновенный елец**

Статус: категория 2. Сокращается численно. При дальнейшем воздействии может перейти в 1 категорию.

В Большом Черемшане всегда был обычным видом со стабильной численностью [Котельников, Семёнов, 2012; Михеев, 2007; Назаренко, Арефьев, 1997]. По данным В.А. Назаренко [Назаренко, Арефьев, 1997] в осенних сетных уловах 1992 года в районе о/л Юность доля ельца составила 4,55% от общей численности. Наши исследования показали, что на разных участках встречаемость ельца колеблется и в среднем составляет в уловах мелкочейистыми сетями 5,25%, в уловах мальковой волокушей – 1,04%.

Средняя длина измеренных особей (5 экз.) без хвостового плавника (ad)  $9,44 \pm 0,29$  см, длина варьировала от 8,5 до 10 см. Масса проанализированных рыб колебалась от 5 до 8 г и в среднем составила  $6,8 \pm 0,56$  г.

### **Обыкновенный голян**

Статус: категория 2. Сокращается численно. При дальнейшем воздействии может перейти в 1 категорию.

Гольян биотопически приурочен скорее к верховьям рек и ниже встречается спорадически. Нашими исследованиями обнаружен не был, но по некоторым данным [Котельников, Семёнов, 2012] единичные экземпляры гольяна отмечаются в уловах в нижнем течении реки Большой Черемшан.

#### **Волжский подуст**

Статус: категория 2. Сокращается численно.

В отличие от гольяна волжский подуст приурочен к низовьям рек. По данным Назаренко [Назаренко, Арефьев, 1997] ранее был многочисленным видом, его количественная доля в уловах колебалась от 7 до 14%. В настоящее время отмечается единично [Котельников, Семёнов, 2012].

#### **Белопёрый пескарь**

Вид утверждён для внесения в список Красной книги Ульяновской области, которая будет издана в 2015 году.

Статус: категория 3. Редкий вид с малой численностью.

Популяция белопёрого пескаря реки Большой Черемшан в настоящее время малочисленна и относительно стабильна. Белопёрый пескарь единично отмечался нами в 2006 г. в районе о/л «Факел» [Михеев, 2007] и редко выше по течению в районе с. Ст. Бесовка в 2011 году совместно с обыкновенным пескарем. Неизвестна динамика встречаемости белопёрого пескаря за 20-летний период. Назаренко В.А. [Назаренко, Арефьев, 1997] приводит данные по пескарю без видового эпитета, поскольку ранее в области числился лишь обыкновенный пескарь, а обитание белопёрого пескаря в области было доказано нами лишь в 2003 году.

В заключение отметим, что река Большой Черемшан является важнейшим резерватом реофильных видов рыб и требует бережного отношения и охраны, особенно в весенний период.

#### **Список литературы**

1. Красная книга Российской Федерации (животные). – М.: Изд-во АСТ Астрель, 2001. – 864 с.
2. Котельников А.А., Семёнов Д.Ю. Ихтиофауна реки Большой Черемшан в границах Ульяновской области // Сб. материалов международной научной конференции: «Любимцевские чтения». – Ульяновск, 2012. – С. 234–236.
3. Михеев В.А. Видовой состав и распределение позвоночных в пойме среднего течения реки Большой Черемшан // Вестник Мордовского ун-та. – 2007. – Вып. 4. – С. 52–54.
4. Назаренко В.А., Арефьев В.Н. Ихтиофауна малых рек Ульяновской области. Ульяновск. – 1997. – 120 с.

## **БАРКОДИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ЖУКА-ОЛЕНЯ *LUCANUS CERVUS* В УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

### **BARCODING POPULATION STUDY OF STAG BEETLE *LUCANUS CERVUS* IN ULYANOVSK REGION**

**Е.А. Артемьева, А.В. Мищенко, Д.К. Макаров, И.А. Мазина  
E.A. Artemyeva, A.V. Mishchenko, D.K. Makarov, I.A. Mazina**

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет  
им. И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: hart5590@gmail.com

**Summary.** A molecular genetic studies *Lucanus cervus* (Linnaeus, 1758) in the Ulyanovsk region. The studied specimens belong to a single population inhabiting the south of Ulyanovsk region and associated upland oak and broadleaved-pine forests.

Жук-олень (Coleoptera, Lucanidae) – редкий вид с сокращающейся численностью и ареалом, включен в Красные книги РФ и Ульяновской области (категория 2) [2008]. В Ульяновской области жук-олень распространен довольно широко; известен из Чердаклинского, Тереньгульского, Сенгилеевского, Барышского, Кузоватовского, Николаевского, Новоспасского, Радищевского, Павловского и Старокулаткинского, Ульяновского, Вешкаймского, Новомалыклинского, Инзенского, Карсунского, Старомайского районов. Ареал вида охватывает Среднюю, Восточную и Южную Европу. Вид приурочен к дубравам. Численность вида повсеместно по ареалу низка и продолжает сокращаться. Лимитирующие факторы: повсеместное сокращение площадей дубрав и сосново-широколиственных лесов; химобработки лесных насаждений [Артемьева и др., 2013].

Для молекулярно-генетических исследований было собрано 7 экз. *Lucanus cervus* (Linnaeus, 1758) в Радищевском (6 экз., 25.06.2014, Радищево) и Старокулаткинском (1 экз., 02.08.2014, Бахтеевка) районах Ульяновской области.

Молекулярно-генетические исследования *L. cervus* включали следующие этапы: экстракция ДНК из тканей насекомого; подбор оптимальных условий полимеразной цепной реакции (ПЦР) (концентрация растворов буфера, праймеров, dNTP, полимеразы, а также температурных условий проведения ПЦР); проведение полимеразной цепной реак-

ции (ПЦР) с целью амплификации участка гена цитохромоксидазы I; аналитический гель-электрофорез амплифицированных фрагментов ДНК с целью определения качества проведённой ПЦР; препаративный гель-электрофорез для разделения продуктов ПЦР-реакции и выбора интересующего фрагмента при сравнении с маркером длин; выделение из геля и очистка участка гена цитохромоксидазы I; проведение сиквеновой реакции с флюоресцентно-меченными дезоксирибонуклеотидами (ddNTP) с последующей очисткой набора терминированных фрагментов; секвенирование полученного фрагмента гена цитохромоксидазы I и получение последовательности нуклеотидов; биоинформационная обработка полученных сиквенов с построением филогении для уточнения систематического положения вида.

Проведено секвенирование полученных амплифицированных фрагментов ДНК *Lucanus cervus* и получены последовательности интересующего участка для всех объектов исследования:

объект № 1

GTTGTTTTAACAGCAGTTCTGCTTCTTCTATCTCTACCTGTACTAG  
CAGGTGCTATTACTATATTATTAACAGACCCGAAATCTTAATACAACCT  
TTTTAGATCCTGCTGGAGGAGGTGACCCAATCCTTTACCAACATTTA  
TTTTGATTCTTCGGCCACCCAGAAGTGATATTTAATTCTACCAGGA  
TTTGGGATAATTTCTCATATCATCAGACAGGAAAGAAGAAAAAAG  
AAACATTTGGAACACTAGGTATAATCTATGCTATAATGGCAATTGGC  
CTTCTTGGATTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTTGGAATA  
GATGTGGATACCCGAGCCTACTTCACATCAGCAACTATTATCATTGC  
TGTTCCCTACTGGAATCAAAATTTTTAGTTGACTTGCTACCC

объект № 2

TTTTAACAGCAGTTCTGCTTCTTCTATCTCTACCTGTACTAGCAG  
GTGCTATTACTATATTATTAACAGACCCGAAATCTTAATACAACCTTTT  
TAGATCCTGCTGGAGGAGGTGACCCAATCCTTTACCAACATTTATTT  
TGATTTTTCGGCCACCCAGAAGTGATATTTAATTCTACCAGGATTT  
GGGATAATTTCTCATATCATCAGACAGGAAAGAAGAAAAAAGAA  
ACATTTGGAACACTAGGTATAATCTATGCTATAATGGCAATTGGCCT  
TCTTGGATTTATTGTATGACCTCATCATATTTACTGTTGGAATAGA  
TGTGGATACCCGAGCCTACTTCACATCAGCAACTATTATCATTGCT  
GTTCCCTACTGGAATCAAAATTTTTAGTTGACTTGCTAC

объект № 3

AGTTCTGCTTCTTCTATCTCTACCTGTACTAGCAGGTGCTATTAC

TATATTATTAACAGACCCGAAATCTTAATACAACCTTTTTAGATCCTG  
CTGGAGGAGGTGACCCAATCCTTTACCAACATTTATTTTTATTCTTC  
GGCCACCCAGAAGTGATATTTAATTCTACCAGGATTTGGGATAAT  
TTCTCATATCATCAGACAGGAAAGAAGAAAAAAGAAACATTTGG  
AACACTAGGTATAATCTATGCTATAATGGCAATTGGCCTTCTTGGATT  
TATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTTGGAATAGATGTGGATAC  
CCGAGCCTACTTCACATCAGCAACTATTATCATTGCTGTTCCCTACTG  
GAATCAAAATTTTTAGTTGACTTGCTACCCCTTATTT

объект № 4

GTTGTTTTTACAGCAGTTCTGCTTCTTCTATCTCTACCTGTACTA  
GCAGGTGCTATTACTATATTATTAACAGACCCGAAATCTTAATACAAC  
CTTTTTAGATCCTGCTGGAGGAGGTGACCCAATCCTTTACCAACAT  
TTATTTGATTCTTCGGCCACCCAGAAGTGATATTTAATTCTACC  
AGGATTTGGGATAATTTCTCATATCATCAGACAGGAAAGAAGAAA  
AAAAGAAACATTTGGAACACTAGGTATTTTCTATGCTATAATGGCA  
ATTGGCCTTCTTGGATTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTT  
GGAATAGATGTGGATACCCGAGCCTACTTCACATCAGCAACTATTA  
TCATTGCTGTTCCCTACTGGAATCAAAATTTTTAGTTGAC

объект № 5

CCTGTACTAGCAGGTGCTATTACTATATTATTAACAGACCCGAAA  
TCTTAATACAACCTTTTTAGATCCTGCTGGAGGAGGTGACCCAATC  
CTTTACCAACATTTATTTTATTCTTCGGCCACCCAGAAGTGATAT  
TTAATTCTACCAGGATTTGGGATAATTTCTCATATCATCAGACAGG  
AAAAAAGAAAAAAGAAACATTTGGAACACTAGGTATAATCTATG  
CTATAATGGCAATTGGCCTTCTTGGATTTATTGTATGAGCTCATCAT  
ATATTTACTGTTGGAATAGATGTGGATACCCGAGCCTACTTCACAT  
CAGCAAATATTATCATTGCTGTTCCCTACCGAATCAAAATTTTTAGT  
TGACTTGCTACT

объект № 6

TTGTTTTAACAGCAGTTCTGCTTCTTCTATCTCTACCTGTACTAG  
CAGGTGCTATTACTATATTATTAACAGACCCGAAATCTTAATACAACC  
TTTTTCGATCCTGCTGGAGGAGGTGACCCAATCCTTTACCAACATT  
TATTTGATTCTTCGGCCACCCAGAAGTGATATTTAATTCTACCA  
GGATTTGGGATAATTTTTCATATCATCAGACAGGAAAGAAGAAAA  
AAAGAAACATTTGGAACACTAGGTATAATCTATGCTATAATGGCAA  
TTGGCCTTCTTGGATTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTTG  
GAATAGATGTGGATACCCGAGCCTACTTCACATCA

объект № 7

CAGTTCTGCTTCTTCTATCTCTACCTGTACTAGCAGGTGCTATTA  
STATATTATTAACAGACCGAAATCTTAATACAACCTTTTTAGATCCT  
GCGGTGGAGGAGGTGACCCAATCCTTTACCAACATTTTTTTGATT  
CTTCGGCCACCCAGAAGTGTATATTTAATTCTACCAGGATTTGGG  
ATAATTTCTCATATCATCAGACAGGAAAGAAGAAAAAAGAAACA  
TTTGGAACACTAGGTATAATCTATGCTATAATGGCAATTGGCCCCCT  
CTTGGAATTTATTGTATGAGTAAAA

Полученные последовательности цитохромоксидазы I от 7 объектов *L. cervus* идентичны и принадлежат к одной популяции жука-олени. Для определения места *L. cervus* в филогенетическом дереве рода проведено сравнение и выравнивание определённого нами участка гена субъединицы I цитохромоксидазы с имеющимися в базе BOLD Systems последовательностями этого гена для следующих видов: *L. datunensis*, *L. formosanus*, *L. fortunei*, *L. fryi*, *L. hayashii*, *L. hermani* и *L. kanoi*. Последовательности были выровнены с помощью программы ClustalW2, дерево построено по методу ближайших соседей в программе JalView (рис. 1).

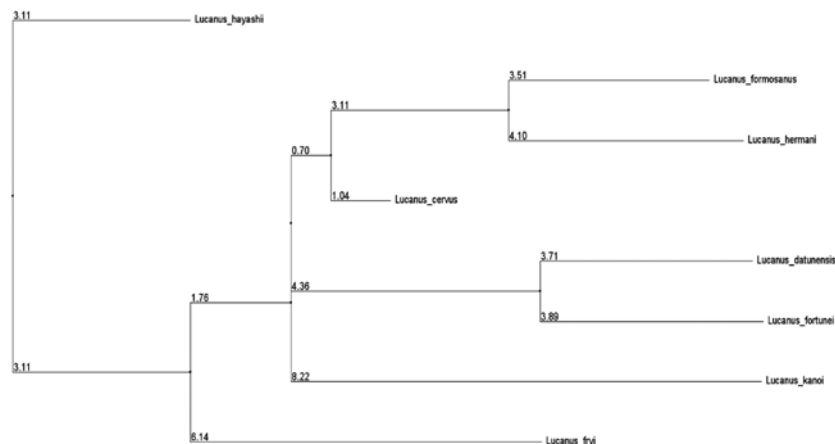


Рисунок 1. Филогенетическое дерево некоторых видов рода *Lucanus*, построенное после выравнивания последовательностей гена цитохромоксидазы I (в программе JalView).

Полученные последовательности цитохромоксидазы I от исследованных особей *L. cervus* идентичны и принадлежат к одной популяции жука-олени, обитающей на юге Ульяновской области и связанной с нагорными дубравами и широколиственно-сосновыми лесами.

Данное исследование проведено при поддержке ФЦП Минобрнауки РФ «Госзадание – 2014».

#### Список литературы

1. Артемьева Е.А., Корольков М.А., Семенов Д.Ю. Материалы по краснокнижным видам избранных групп животных фауны Ульяновской области. – Ульяновск: Корпорация технологий продвижения, 2013. – 88 с.
2. Красная книга Ульяновской области / Под науч. ред. Е.А. Артемьевой, О.В. Бородина, М.А. Королькова, Н.С. Ракова; Правительство Ульяновской области. – Ульяновск: Изд-во «Артишок», 2008. – 508 с.

### ПАЗИТОФАУНА БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ РЕКИ СВЯЯГИ В ПРЕДЕЛАХ Г. УЛЬЯНОВСКА

#### PARASITE FAUNA OF GASTROPODS OF THE SVIYAGA RIVER WITHIN ULYANOVSK

О.И. Савенко<sup>1</sup>, Д.С. Игнаткин<sup>2</sup>, Н.А. Ленгесова<sup>1</sup>  
O.I. Savenko<sup>1</sup>, D.S. Ignatkin<sup>2</sup>, N.A. Lengesova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И. Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk State Pedagogical University named after I.N. Ulyanov", Russian Federation, Ulyanovsk

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Российская Федерация, Ульяновск  
FSBEI HPE "Ulyanovsk state agricultural Academy named after P.A. Stolypin", Russian Federation, Ulyanovsk

**Summary.** Six species of trematode were found in five species of gastropods in the river Sviyaga within Ulyanovsk.

У представителей малакофауны довольно разнообразная экологическая роль в экосистеме, они являются облигатным звеном в циклах развития множества видов гельминтов, прежде всего, трематод. Зараженность моллюсков гельминтами может служить важным показателем уровня биологической опасности водных объектов разного значения.

Работы, которые рассматривают малакофауну Среднего Поволжья, немногочисленны и касаются в основном отдельных видов моллюсков

или водоемов [Торопкин, Гусаров, 1970; Абдулкин, 2002, 2004; Каменев, 1993]. Паразитофауна также изучена достаточно фрагментарно, так, указывается, что на Раифском участке Волго-Камского заповедника обнаружено 27 видов трематод [Любарская, 1987], на Саралинском участке – 18 видов паразитов, которые были встречены в 13 видах моллюсков. Для Ульяновской области приводится 26 видов брюхоногих моллюсков, в которых было встречено 59 видов трематод [Игнаткин, 2007].

Цель нашей работы – изучить биологию и экологию паразитофауны моллюсков реки Свияги в пределах г. Ульяновска.

Сбор моллюсков осуществлялся с мая по сентябрь 2014 года в соответствии с известными методическими рекомендациями [Жадин, 1960; Здун, 1961; Горохов, 1980]. Моллюсков собирали вручную, внимательно осматривая дно на мелководных местах, а также, извлеченные из воды предметы, которые могут быть субстратом для обитания малакофауны (растения, коряги и другие объекты). Сбор осуществлялся в прибрежной части реки в илистом грунте в 5 точках левого берега реки Свияги в пределах г. Ульяновска.

Паразитологические исследования моллюсков проводили в соответствии с общепринятыми методами [Здун, 1961; Горохов, 1980; Беэр и др., 1987]. Наиболее обычным местом локализации паразитов брюхоногих моллюсков является пищеварительная железа (гепатопанкреас), которая располагается в верхней части раковины (2–3 первых оборота). При вскрытии у моллюсков сем. Viviparidae с помощью пинцета отделяли верхнюю раковины по шву, у представителей сем. Limnaeidae – наискось по отношению ко шву, а моллюсков сем. Planorbidae вскрывали поперек шва. Извлеченную пищеварительную железу помещали на компрессорный и исследовали при малом увеличении микроскопа (20x4). Для количественной оценки инвазивности моллюсков использовали такой показатель, как экстенсивность инвазии, понимая под ней отношение инвазированных моллюсков к общему числу обследованных особей данной группы (в %). Всего было исследовано 188 моллюсков, определение малакофауны велось по Хейсину [1962], определение паразитофауны велось по работе Видеркер и др. [2009].

В ходе исследования было встречено 5 видов брюхоногих моллюсков, которые относятся к 3 родам. В сборах существенно преобладали особи речной живородки *Viviparus viviparus* (L., 1758) (82,4%), представители ушковидного прудовика *Limnaea auricularia* (L., 1758) составили 12,7%, большого прудовика *L. stagnalis* (L., 1758) 5,3%, по одной особи были встречены такие виды, как яйцевидный прудовик *L. ovata* (Draparnaud, 1805) и катушка окаймленная *Planorbis planorbis*

(L., 1758). У последних двух видов моллюсков личинки паразитов не обнаружены.

Из исследованных 188 особей 108 оказались зараженными различными видами паразитов (табл. 1). Максимальный уровень экстенсивности инвазии был отмечен у моллюсков *Viviparus viviparus* и составил 65,8%, что согласуется с данными других исследователей.

Таблица 1  
Количество зараженных особей моллюсков личинками трематод в р. Свияге в пределах г. Ульяновска

Вид моллюска	Всего особей	Кол-во зараженных особей	Экстенсивность инвазии, %
<i>Viviparus viviparus</i>	155	102	65,8
<i>Limnaea stagnalis</i>	10	4	40
<i>Limnaea auricularia</i>	24	2	8,33
Всего	188	108	57,45

Установлено нахождение следующих видов паразитов:

*Neoacanthoparyphium echinatoides* (de Filippi, 1854) Odening, 1962 (Echinostomatidae Dietz, 1909);

*Hypoderaeum conoideum* (Bloch, 1782) (Echinostomatidae Dietz, 1909);

*Echinostoma robustum* Yamaguti, 1935 (Echinostomatidae Dietz, 1909);

*Leucochloridiomorpha constantiae* (Müller, 1935) Gover, 1938 (Leucochloridiomorphidae Gover, 1938);

*Plagiorchis* sp. (Plagiorchiidae Lühe, 1901 emend. Ward, 1917);

*Xiphidiocercariae* sp. VII (*Cercaria pugnax* La Val.). Личинка с неясным систематическим положением [Игнаткин, 2007]. По последним представлениям это сборная группа. Окончательный хозяин марицы этой трематоды не установлен. Был найден в *Viviparus viviparus*.

Таким образом, паразитофауна брюхоногих моллюсков реки Свияги включает в себя 6 видов, относящихся к 3 семействам из 3 отрядов. Все обнаруженные паразиты были встречены в моллюске *Viviparus viviparus*. Паразит *Neoacanthoparyphium echinatoides* единично встречен в моллюсках *Limnaea stagnalis* и *L. auricularia*, а *Hypoderaeum conoideum* – в моллюске *L. auricularia*.

Поскольку для водоемов Ульяновской области приводится 59 видов личинок трематод, то есть основания полагать, что фауна трематод реки Свияги требует более детального изучения.

## Список литературы

1. Абдулкин Г.В. Материалы к фауне пресноводных моллюсков (Mollusca: Bivalvia) из семейств Pisiidiidae и Sphaeriidae // Природа Симбирского Поволжья: Сб. научн. тр. – 2004. – Вып. 3. – С. 186–187.
2. Абдулкин Г.В., Алеев Ф.Т., Золотухин В.В.. *Dreissena rostriformis* (Mollusca: Bivalvia) – новый для Ульяновской области вид двустворчатых моллюсков // Природа Симбирского Поволжья. – 2002. – Вып. 3. – С. 186–187.
3. Безр С. А., Белякова Ю. В., Сидоров Е. Г. Методы изучения промежуточных хозяев возбудителя описторхоза. – Алма-Ата: Наука КазССР, 1987. – 85 с.
4. Видеркер М.А., Игнаткин Д.С., Индирякова Т.А. Атлас церкарий трематод Среднего Поволжья, 2009 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.cercat.narod.ru> (дата обращения: 01.10.2014).
5. Горохов В.В. Методические рекомендации по изучению патологии моллюсков. – М.: Из-во АН СССР, 1980. – 72 с.
6. Жадин В.И. Методы гидробиологического исследования. – М.: Высшая школа, 1960. – 191 с.
7. Жадин В.И. Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. – М.-Л., 1952. – 374 с.
8. Здун В.И. Обследование моллюсков на зараженность личинками дигенетических трематод. – В кн.: Методы изучения паразитологической ситуации и борьба с паразитами сельскохозяйственных животных. – Киев: АН УССР, 1961. – С. 96–134.
9. Игнаткин Д.С. Видовое разнообразие малакофауны и её роль в формировании очагов трематодозной инвазии на территории Ульяновской области: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 17 с.
10. Каменев А.Г. Биопродуктивность и биоиндикация правобережного Средневолжья: Макрозообентос. – Саранск: Мордов. ун-т, 1993. – 228 с.
11. Любарская О. Д., Голубев А. И., Калина И. А. Полиморфизм сенсилл стилетной церкарии *Cercaria rugnax* (Trematoda) // Паразитология. – 1987. – Т. 21. – Вып. 5. – С. 673–677.
12. Сударинов В.Е., Шигин А.А., Курочкин Ю.В. Метацеркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России. М.: Наука, 2002. – 298 с.
13. Торопкин А.А., Гусаров Г.Н. К фауне и экологии наземных моллюсков Ульяновской области // Труды УСХИ. – 1970. – Т. 16. – Вып. 4.
14. Хейсин Е.М. Краткий определитель пресноводной фауны. – М.: Учпедгиз, 1962. – 148 с.

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ ПОЕНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

### BACTERIAL INDICATORS OF WATER USED FOR WATERING FARM ANIMALS

**Н.М. Колычев, В.И. Плешакова, А.А. Новицкий,  
Н.А. Лещёва, А.Н. Колотило**  
**N.M. Kolychev, V.I. Pleshakova, A.A. Nowicki,  
N.A. Lescheva, A.N. Kolotilo**

*ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет  
им. П.А. Столыпина» МСХ РФ, Российская Федерация, Омск*

*Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Professional  
Education “Omsk State University of Agriculture named after P.A. Stolypin”,  
Russian Federation, Omsk*

**Summary.** Results of researches of microbiocenoses of the water used for water supply of the livestock enterprises of Omsk Priirtyshje and their correction are presented in article. Sanitary and bacteriological monitoring of biotopes of objects of animal husbandry is carried out. It is established that water supply of a number of complexes and farms doesn't conform to modern safety requirements, systematic bacteriological quality control of water is practically absent. For efficiency of agricultural production in the Omsk region methodical recommendations are offered.

**Введение.** Уровень сельскохозяйственного производства в последние годы предопределил высокие темпы развития водоснабжения. В значительной степени это относится к животноводству, где помимо производственных целей вода в значительных количествах используется для поения скота. При этом контроль питьевой воды не осуществляется и она зачастую поступает из различных водоёмов без какой либо проверки на бактериальную загрязненность [Банников, 2006; Брылин, Листкова, 2006; Горковенко, 2006].

Первостепенное значение имеют патогенные и условно-патогенные бактерии семейства Enterobacteriaceae, способные адаптироваться к различным абиотическим и биогенным факторам, а также постоянно циркулирующие в объектах окружающей среды, в том числе и в водоис-

точниках [ГОСТ Р 51592-2000; ГОСТ Р 51593-2000; Методика эколого-гигиенической оценки. . ., 2005]. В организме животных вода выступает в роли транспортной системы и растворителя, с её участием осуществляются физико-химические реакции, связанные с обменом веществ, выводятся вредные вещества [Немцева и др., 1994]. Трудно переоценить роль воды во всех процессах жизнедеятельности организма животных, здоровье которых во многом определяется уровнем гигиены водоснабжения [СанПин 2.1.4.1074-01]. Наличие в питьевой воде патогенной и условно-патогенной микрофлоры в большинстве случаев создает потенциальную угрозу возникновения и распространения кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и их гибели [СанПин 2.1.4.1175-02; Сас, 2007; Хотько, Дмитриев, 2002].

**Цель** настоящего исследования: изучить особенности технологических систем водоснабжения сельскохозяйственных предприятий; микробиологические и физико-химические показатели воды с учетом использования различных технологий поения животных в хозяйствах Омской области; биологические характеристики основных сочленов микробиоценоза биоэкосистемы воды и биопленки.

**Материалы и методы.** Объектом микробиологических исследований служили пробы воды, а также выделенные культуры микроорганизмов. Для бактериологического исследования были отобраны пробы воды в весенне-летний и осенне-зимний периоды из разводящей водопроводной сети в хозяйствах с децентрализованным (n=108) и централизованным (n=45) водоснабжением в объеме 1,5 л, также пробы воды из чашечных и ниппельных сосковых поилок (n=62).

Бактериологическому анализу были подвергнуты пробы полимикробной пленки (биопленки) с технологических элементов водопроводного оборудования (n=68). Посевы проб полимикробной пленки осуществляли по общепринятым методикам.

Патогенные свойства выделенных культур изучали при внутрибрюшинном заражении белых мышей одного возраста. Чувствительность выделенных культур микроорганизмов к антимикробным препаратам определяли дискодиффузным методом с использованием стандартных дисков, содержащих антибиотики.

Видовую принадлежность микроорганизмов выявляли согласно Определителю бактерий Берджи [1997а; 1997б].

В целях изучения эффективности применения препарата «Байкал-ЭМ1» для оптимизации микробиологических показателей воды, используемой для поения животных был проведен эксперимент. ЭМ-препарат в разной концентрации вносили в пробы воды, которую одновременно с

контрольной пробой культивировали при +18–20°C в течение трех суток. При анализе и обработке экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel и пакет программ Statistica.

**Результаты и их обсуждение.** В результате проведенных исследований установлено, что в водоснабжении сельскохозяйственных предприятий области преобладают подземные водные источники. Централизованная система водоснабжения обеспечивает лишь 17% хозяйств, которые находились вблизи крупных населенных пунктов. В 21,5% хозяйств использовалась механическая очистка, а в 58,5% очистка воды не проводилась.

Во всех хозяйствах отсутствовал систематический контроль качества воды. Наибольшей степенью микробной обсемененности характеризовались пробы воды, отобранные в осенне-зимний период, которая была в 1,3–3 раза выше по сравнению с весенне-летним.

При исследовании проб воды децентрализованного водоснабжения на наличие общих колиформных бактерий (ОКБ) и термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) установлено, что ОКБ в весенне-летний период отмечали во всех пробах. При этом ТКБ регистрировали в 33,3% случаев, независимо от сезона года. В результате бактериологического исследования было установлено, что во всех пробах воды содержалась 271 культура микроорганизмов, принадлежащих к 11 родам и 12 видам. В микробном спектре питьевой воды для животных, не зависимо от сезонных факторов, преобладали микроорганизмы *E. coli* – (53,7%–100%), *Pseudomonas* spp. – (22–46%), *Proteus* – (20,4–33%), *Enterococcus* spp. – (24–35%) случаев. В весенне-летний период в большинстве случаев дополнительно выделяли – граммотрицательную микрофлору – *E. aerogenes* (31,4%), *Proteus* spp. (33,0%), *Citobacter* spp. (20,4%), *S. aureus* (14,8%), *Enterococcus* spp. (24,0%) *Clostridium* spp. (7,4%). В осенне-зимний период преобладали грамположительные кокковые микроорганизмы и клостридии – *St. aureus* (24,0%), *Enterococcus* spp. (35,0%), *Clostridium* spp. (16,7%), *E. aerogenes* (13,0%), *Proteus* spp. (20,4%), *Citrobacter* spp. (9,3%) (табл. 1).

Установлено, что водопроводная вода животноводческих предприятий, имеющих централизованную систему водоснабжения, только в 75,6% случаев отвечала требованиям, предъявляемым к воде питьевой.

По результатам исследования воды из поилок было установлено, что все пробы не соответствовали санитарно-гигиеническим показателям. Наиболее высокие показатели микробной обсемененности регистрировали в пробах воды из чашечных поилок, где показатель ОМЧ был в 3–4 раза выше, чем в воде сосковых поилок. Кроме того, состав микро-

флоры в пробах воды, взятых из чашечных поилок, отличался наличием плесневых грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*.

Таблица 1  
Видовой состав микрофлоры питьевой воды для сельскохозяйственных животных (нецентрализованное водоснабжение)

Виды микроорганизмов	Весенне-летний период		Осенне-зимний период	
	Кол-во изолятов	Процент регистрации	Кол-во изолятов	Процент регистрации
<i>E. coli</i>	54	100	29	53,7
<i>P. aeruginosa</i>	25	46	12	22
<i>E. aerogenes</i>	17	31,4	7	13
<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i>	11	20,4	5	9,3
<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>	18	33	11	20,4
<i>Y. enterocolitica</i>	5	9,3	1	1,9
<i>K. ozaenae</i>	6	11	2	3,7
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	13	24	18	35
<i>S. aureus</i>	8	14,8	13	24
<i>Clostridium</i> spp.	4	7,4	9	16,7
<i>Salmonella</i> spp.	2	3,7	1	0,54
Итого:	163	-	108	-

В воде, поступающей на животноводческие фермы и комплексы, установлено превышение предельно допустимых норм общего микробного числа (ОМЧ) в 12 пробах (27,2%); общих колиформных бактерий (ОКБ) в 28 пробах (63,6%); термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) в 13 пробах (29,5%). Энтерококки обнаружили в 33 пробах (75%). Требования СанПин не соответствовали 28 проб воды (63,6%).

Из 100 идентифицированных культур условно-патогенной микрофлоры на долю *E. coli* приходилось 23%, в т. ч. 30,4% из них обладали гемолитическими свойствами; *E. cloacae* 9%, из которых 33,3% обладали гемолитическими свойствами; *E. faecium* – 11%, в т. ч. (54,5%) обладали гемолитическими свойствами; *E. faecalis* (32%), в т. ч. 59,3% обладали гемолитическими свойствами; на долю *K. pneumoniae* приходилось 4%, в т. ч. 75% из них обладали гемолитическими свойствами.

В результате проведенных исследований проб полимикробной плёнки систем водоснабжения животноводческих помещений также наиболее часто регистрировали *E. coli* (35,3%), *P. aeruginosa* (26,5%), *Clostridium*

spp. (13,3%), *E. aerogenes* (13,2%), *Enterococcus* spp. (8,8%) и *Proteus* spp. (7,4%).

При бактериологическом исследовании поверхности биоплёнки чаще регистрировали *P. aeruginosa* и *S. aureus*: в глубинных слоях – *E. coli*, БГКП, энтерококки и *Clostridium* spp. Культуры, выделенные из полимикробной плёнки, обладала выраженными персистентными свойствами (адгезивной, антикомplementарной, антиинтерфероновой и антилизозимной активностью), а также патогенностью для лабораторных животных.

Выявление связи развития у животных диарейного симптомокомплекса с уровнем микробной обсеменённости воды позволило установить достоверную корреляцию проявления диарейного симптомокомплекса с общим микробным числом питьевой воды в весенне-летний период.

Самое низкое качество питьевой воды регистрировали в мае со средним показателем ОМЧ  $3,77 \pm 0,1 \times 10^2$  КОЕ/мл, в этот же период отмечено увеличение случаев проявления диарейного симптомокомплекса у телят в среднем у 7% от общего поголовья.

Проведённое бактериологическое исследование проб воды с внесённым препаратом «Байкал-ЭМ1» в различных дозах, по окончании трёх суток (срок наблюдения), показало, что во всех пробах доминирующими микроорганизмами являются бактерии группы кишечной палочки при отсутствии гемолитических культур микроорганизмов и плесневых грибов.

Состав микрофлоры в контрольном образце при завершении эксперимента соответствовал выявленному при первичном бактериологическом исследовании. Отличие заключалось в том, что дополнительно были зарегистрированы плесневые грибы.

**Заключение.** Вода, которая используется для поения животных, часто не соответствует санитарным нормам и изначально контаминирована условно-патогенной микрофлорой, и при определенных условиях может явиться фактором, способствующим развитию диарейного симптомокомплекса у молодняка сельскохозяйственных животных. Поэтому исследование воды имеет немаловажное значение для профилактики болезней, передача которых возможна через источники водоснабжения. Проведённые опыты по применению препарата «Байкал-ЭМ1», свидетельствуют, что добавление его в воду в определённых разведениях позволяет оптимизировать её микробиологические показатели.

### Список литературы

1. Банников В. Аспекты гигиены воды в сельскохозяйственной отрасли // Био. – 7. – 2006. – С. 23–24.
2. Брылин А.П., Листкова Н.А. Гигиена снабжения питьевой водой // Ветеринария. – 2006. – № 11. – С. 11–12.
3. Горковенко Н.Е. Микробиологический мониторинг источников питьевой воды / Ветеринария. – 2006. – № 6 – С. 41–43.
4. ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».
5. ГОСТ Р 51593-2000 «Вода питьевая. Отбор проб».
6. Методика эколого-гигиенической оценки питьевой воды; используемой для поения с.-х. животных (Рекомендации). – Благовещенск: Дальневост. науч.-метод. центр., ДальЗНИВИ, 2005. – 28 с.
7. Немцева Н.В., Мисетов И.А., Алехина Г.П. Определение свежего фекального загрязнения воды поверхностных водоемов // ЖМЭИ. – 1994. – № 4. – С. 120–123.
8. Определитель бактерий Берджи: В 2 т., Т. 1 / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997а. – 432 с.
9. Определитель бактерий Берджи: В 2 т., Т. 2 / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997б. – 368 с.
10. СанПин 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».
11. СанПин 2.1.4.1175-02 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников».
12. Сас Т. Вода – важнейшее питательное вещество // Животноводство России. – 2007. – № 6. – С. 28–29.
13. Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Водный фактор в передаче инфекции. – Пенза: ПГУ, 2002. – 232 с.

## СЕКЦИЯ 6. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

### 3D-МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МАТРИЧНЫХ СИНТЕЗОВ

#### 3D-MODELING PROCESS OF MATRIX SYNTHESIS

**С.Д. Винокуров**  
**S.D. Vinokurov**

*ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный педагогический университет  
им. И.Н. Ульянова, Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk*

**Summary.** In this article the way to solve the problems of visualization of the processes of matrix synthesis is discussed.

Процессы матричного синтеза отличаются фундаментальностью, многостадийностью и сложностью восприятия. В настоящее время не существует 3D-материалов, способных достаточно полно и понятно объяснить данные процессы. Поэтому актуальной остается проблема визуализации процессов матричного синтеза в образовательных, научных и исследовательских целях.

Эта проблема разрешима с помощью создания образовательного мультимедийного продукта, состоящего из учебно-методического материала и видеороликов, и решающего следующие задачи:

- 3D визуализация процессов матричного синтеза и представление их в видео-формате;
- формирование образного мышления учеников в понимании сложных молекулярных процессов;
- комплектация школ учебно-методическим комплексом, в котором: строго соблюдается последовательность этапов синтеза, терминология, визуализированы и смоделированы в пространстве взаимодействия молекул белков, ДНК, РНК и дополнительных факторов синтеза.

Создание подобного продукта протекает в несколько этапов, обусловленных сложностью и постановкой задачи.

Первый этап – поиск существующих точных описаний молекул,

участвующих в процессе матричных синтезов, например, нуклеиновых кислот и азотистых оснований. В качестве решения используются pdb-файлы. PDB (Protein Data Bank) формат представляет из себя текстовый файл, содержащий положение атомов в молекуле и взаимосвязи между этими атомами. Данный формат широко используется в программах, работающих с молекулами. База данных Zinc [<http://zinc.docking.org>] содержит описания большого количества органических молекул, в том числе необходимые для проекта.

Поскольку 3D-редакторы зачастую не могут работать с pdb-файлами, необходима конвертация в популярные 3D-форматы. Существует несколько путей решения этой проблемы.

Первый путь – использование дополнительного программного обеспечения, например, VMD Molecular Graphics Viewer. Оно позволяет визуализировать файл в pdb формате и конвертировать его в файлы формата obj, сохраняющий структуру модели, и mtl, сохраняющий материалы, из которых модель состоит. Далее выполняется экспорт полученных файлов в пакет 3D графики – Blender или Maya.

Второй путь – воссоздание молекул из текстового файла с помощью воссоздания точной копии по координатам. Этот способ более ресурсозатратный, однако в дальнейшем позволяет использовать методы, ускоряющие процесс рендеринга.

На полученные в результате преобразований 3D-модели зарегистрирована база данных [Винокуров, 2014].

Третий шаг самый сложный, поскольку именно здесь происходит создание трехмерных сцен. Для облегчения анимирования целесообразно применять скрипты, позволяющие точно позиционировать все элементы сцены. В итоге, расположение всех молекул в сцене в каждый момент времени рассчитывается редактором трехмерной графики.

После создания сцены, предполагается рендеринг, сохраняющий каждый кадр в отдельный файл. С помощью видеоредакторов или Video Sequence Editor (входящего в пакет Blender) производится монтаж видео, конвертируемого в дальнейшем в популярные форматы.

#### Список литературы

1. ZINC: свободная база данных [Электронный ресурс]. URL: <http://zinc.docking.org> (дата обращения: 1.10.2014).
2. Винокуров С.Д. База данных 3D-модели молекул живой клетки. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2014620800. Зарегистрировано в Реестре баз данных 2 июня 2014 года.

## ОБ ОДНОЙ МОДЕЛИ СУТОЧНОЙ ТЕРМОМЕТРИИ ТЕПЛОвого ГОМЕОСТАЗА ЧЕЛОВЕКА

### ON A MODEL OF HUMAN BODY TEMPERATURE DAILY VARIATION

Ю.В. Цыганова  
Yu.V. Tsyganova

*ФГБОУ ВПО Ульяновский государственный университет,  
Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State University, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: jvt.ulsu@gmail.com*

**Summary.** In this talk, we discuss the following problems: 1) We consider a four dimension discrete stochastic state space model, which can be used for the human body temperature daily variation mathematical modelling. 2) We propose solutions to the problem of parameter identification of this model. 3) The results of computational experiments in the MATLAB are shown. We make a conclusion upon the obtained results.

**Математическая модель процесса суточной термометрии теплового гомеостаза человека.** В недавней работе [Semushin et al., 2013] авторами впервые построены математические модели процесса суточной термометрии теплового гомеостаза человека, представленные в виде стохастической линейной дискретной системы, заданной уравнениями в пространстве состояний. Подробно изучены модели третьего порядка, исследованы процессы параметрической идентификации в случае, когда среднесуточная температура заранее известна.

Здесь рассмотрим математическую модель четвертого порядка, заданную в пространстве состояний. Предполагаем, что среднесуточная температура неизвестна. Расширив вектор состояния модели третьего порядка за счёт включения в него в качестве последней компоненты среднесуточного уровня температуры, получим дискретную модель четвертого порядка, записанную в соответствии с терминологией [Maybeck, 1979]:

$$x_{t+1} = \begin{bmatrix} \cos \omega_n \tau & -\sin \omega_n \tau & 0 & 0 \\ \sin \omega_n \tau & \cos \omega_n \tau & 0 & 0 \\ 0 & 0 & d & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} x_t + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ \sigma \sqrt{1-d^2} \\ 0 \end{bmatrix} w_t \quad (1)$$

$$z_t = [1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1] x_t + v_t, \quad (2)$$

где  $x_0 = [0.5 \ -0.5 \ 0 \ u^*]^T$ ,  $d \equiv e^{-\lambda\tau}$ ,  $z_t$  – измерения температуры тела человека,  $\tau = 5 \text{ мин}$  – интервал измерений,  $w_t$  – дискретный гауссовский белый шум с единичной ковариацией,  $\omega_n = 2\pi/T_n$ ,  $T_n = 24 \text{ ч}$ ,  $v_t$  – ошибка измерения с нулевым средним и ковариацией  $R = (0.125)^2$ ,  $u^* = 36.0^\circ \text{ C}$  – начальное значение среднесуточного уровня температуры здорового человека и  $\theta = [\lambda \ \sigma]^T$  – вектор неизвестных параметров модели, подлежащий идентификации.

#### Идентификация неизвестных параметров дискретной модели.

Одним из наиболее известных методов параметрической идентификации дискретных линейных моделей является *метод максимального правдоподобия* [Gupta, Mehra, 1974]. Для численной минимизации критерия правдоподобия будем использовать градиентный метод с заданным начальным значением параметра  $\theta$ . Данный алгоритм требует построения уравнений чувствительности для вычисления частных производных оценок вектора состояния относительно неизвестных параметров. Стандартным подходом является прямое дифференцирование уравнений фильтра Калмана [Grewal, Andrews, 2001], приводящее к набору векторных уравнений чувствительности фильтра. Альтернативным подходом для вычисления требуемых для градиентного алгоритма величин являются новые устойчивые к ошибкам машинного округления методы на базе ортогонализированных UD-фильтров [Цыганова, 2014; Tsyganova, Kulikova, 2013].

В недавней работе [Цыганова, 2014] автором построен новый *адаптивный расширенный ортогонализированный UD-фильтр*. Применим этот результат для решения задачи параметрической идентификации дискретной модели (1), (2) и приведём результаты вычислительных экспериментов.

**Вычислительные эксперименты.** При заданном (*истинном*) значении системного параметра  $\theta$ , смоделирована последовательность из 576 измерений, что соответствует измерениям температуры тела человека в течение двух суток с интервалом в 5 минут. Затем полученные данные были поделены на две части, каждая из которых представляет собой

суточные измерения температуры тела человека. Первая часть использовалась для идентификации неизвестного параметра  $\theta$ , а вторая – для оценивания вектора состояния системы с найденным значением неизвестного параметра. Все программные коды написаны на языке MATLAB.

На рис. 1 показаны результаты параметрического оценивания модели (1), (2) при найденных значениях параметра  $\hat{\theta} = [0.01 \ 0.27]^T$ : красные точки – вторая часть измерений с 289-го по 576-ое, чёрная сплошная линия – график оценки суточной динамики температуры тела человека, синяя сплошная линия – график оценки среднесуточного уровня температуры.

**Заключение.** В работе рассмотрена стохастическая дискретная модель четвёртого порядка, заданная в пространстве состояний и предназначенная для математического моделирования процесса суточной термометрии теплового гомеостаза человека. Предложен способ решения задачи параметрической идентификации указанной модели с применением расширенного ортогонализированного адаптивного UD-фильтра и метода максимума правдоподобия. Проведены вычислительные эксперименты в системе MATLAB. Результаты вычислительных экспериментов подтверждают способность стохастической дискретной модели (1), (2) воспроизводить циркадный ритм суточной динамики температуры здорового человека.

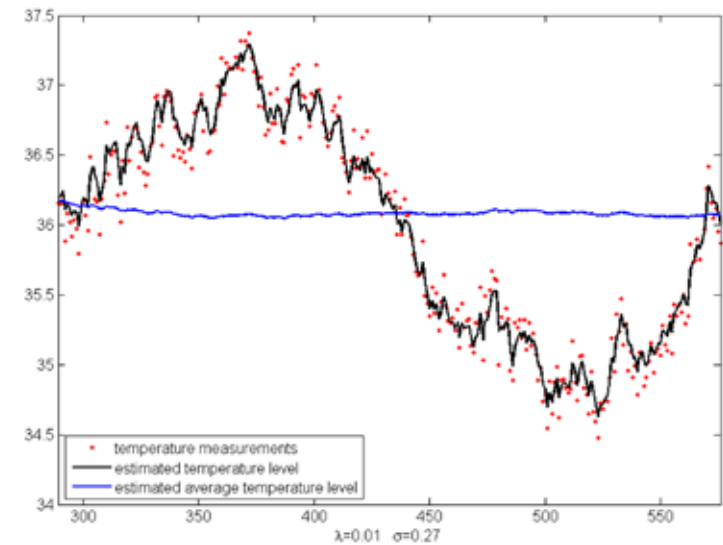


Рисунок 1. Результаты параметрического оценивания модели

**Благодарности.** Автор благодарит РФФИ за финансовую поддержку, обеспеченную грантом № 13-01-97035 (p\_поволжье\_a) в течение 2013–2014 гг.

#### Список литературы

1. Цыганова Ю.В. Об одном подходе к построению адаптивного UD-фильтра для параметрической идентификации LQG систем / Труды XII Всероссийского совещания по проблемам управления ВСПУ-2014. Москва, 16–19 июня 2014 г. – М.: Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН, 2014. – С. 2741–2751.
2. Grewal M.S., Andrews A.P. Kalman filtering: theory and practice. – New Jersey: Prentice-Hall, 2001. – 401 p.
3. Gupta N.K., Mehra R.K. Computational Aspects of Maximum Likelihood Estimation and Reduction in Sensitivity Function Calculations // IEEE Trans. Automat. Contr. – 1974. – Vol. 19. – No. 6. – P. 774–783.
4. Maybeck P.S. Stochastic Models, Estimation and Control. Volume 1. – New York: Academic Press. – 1979. – 423 p.
5. Semushin I.V., Tsyganova J.V., Skovikov A.G. Identification of a Simple Homeostasis Stochastic Model Based on Active Principle of Adaptation / Proc. 15th Applied Stochastic Models and Data Analysis International Conference, ASMDA-2013. – 2013. – P. 775–783.
6. Tsyganova J.V., Kulikova M.V. State sensitivity evaluation within UD based array covariance filters // IEEE Trans. Automat. Contr. 2013. – 2013. – Vol. 58. – No. 11. – P. 2944–2950.

## СЕКЦИЯ 7. НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ РАБОТЫ УЧАЩИХСЯ

### ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ В ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ПОЛОСТИ РТА ЧЕЛОВЕКА

#### THE USE OF MOLECULAR CLONING FOR IDENTIFICATION OF THE BACTERIA OF ORAL CAVITY

Мищенко А.В.<sup>1,2</sup>, Хузина Р.М.<sup>1</sup>, Соловьёв Д.А.<sup>3</sup>  
Mishchenko A.V.<sup>1,2</sup>, Khuzina R.M.<sup>1</sup>, Soloviyev D.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk  
<sup>2</sup> E-mail: a.misch@mail.ru

<sup>3</sup> МОУ Новоульяновская средняя общеобразовательная школа № 1,  
Российская Федерация, Новоульяновск  
Novoulyanovsk Middle School № 1, Russian Federation, Novoulyanovsk

**Summary.** The article describes the molecular cloning methods for detection of bacteria that inhabit the mucous membranes of the mouth and teeth.

Проблема идентификации микроорганизмов, развивающихся в организме человека в норме и патологии, является весьма актуальной для современной биологии и медицины, поскольку влияние микрофлоры на наш организм начинает сказываться уже в момент рождения и продолжается всю жизнь [Ильина, Касаткина, 2008; Касаткина, Ильина, 2008; Карпеева и др., 2008; Красноперова и др., 2011]. По современным данным, различные среды организма человека населяет более 10000 видов разнообразных бактерий общей массой более 2 кг [Human Microbiome Project]. При определении конкретных видов классическими методами с использованием посевов могут возникнуть затруднения, связанные с невозможностью культивировать бактерии отдельных видов на питательных средах и субъективными ошибками при проведении микробиологических исследований (неправильный забор и консервация биологи-

ческого материала с микрофлорой, отсутствие навыков идентификации при микроскопии и пр.). Современные молекулярно-генетические методы исследования, например, такие, как молекулярное клонирование, позволяют с высокой степенью достоверности определить в образце (ткани, биологической жидкости и т.д.), содержащем несколько микроорганизмов (метагеном), любой вид бактерий (в том числе патогенных). Целью данной работы являлась отработка метода молекулярного клонирования для определения некоторых видов бактерий, населяющих слизистую полости рта человека.

Материал (бактериальная плёнка) собирался стерильной ватной палочкой с поверхности щеки и зубов испытуемого в течение 2 мин. и переносился в предварительно автоклавированную пластиковую пробирку объёмом 2 мл с деионизированной водой. Для разрушения клеток пробирку нагревали до 95°C при постоянном перемешивании в термо-шейкере BioShake (Analytik Jena) в течение 15 мин, затем замораживали при -20°C. После оттаивания при комнатной температуре, полученную суспензию, содержащую бактериальный дебрис, использовали как матрицу для амплификации интересующего участка ДНК микробов. В качестве генетического маркера использовали участок гена 16S рибосомальной РНК, который фланкировали праймерами: прямой – AGAGTTTGATCCTCCCTCAG и обратный – ACGGCTACCTTGTTACGACTT. Для успешной амплификации фрагмента был подобран состав реакционной смеси для полимеразной цепной реакции (ПЦР): 1х буфер, дезоксирибонуклеотиды (250 мкМ), праймеры (0.25 мкМ), taq-полимераза (10 ед.), деионизированная вода, матрица ДНК (3 мкл). ПЦР проводили в пробирках объёмом 0.2 мл с использованием амплификатора SpeedCycler 2 (Analytik Jena) со следующими температурными параметрами: денатурация ДНК проходила при 94°C в течение 2 мин, циклирование – плавление матрицы при 94°C, 30 с; отжиг праймеров при 55°C, 30 с; элонгация цепи при 72°C, 1 мин (всего 30 циклов); окончательная достройка цепей проводилась при 72°C в течение 5 мин. После завершения реакции по 5 мкл смеси наносили на 1% агарозный гель для оценки качества ПЦР и разделения фрагментов; после чего готовился препаративный гель, из которого проводили выделение и очистку фрагментов нужной длины (около 1400 п.о.) (при этом использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific)).

Очищенные фрагменты гена 16S рибосомальной РНК бактерий лигировали с вектором pTZ57R/T по протоколу из набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), при этом готовили смесь, содержащую компоненты: 5X Ligation Buffer, Vector pTZ57R/T (55 нг/мкл), T4 DNA Ligase (5 у/мкл), очищенный ПЦР-продукт (10 мкл), деионизированная

вода. По 2 мкл полученного лигата электропорировали (с помощью MicroPulser Electroporator, Bio-Rad) с 50 мкл суспензии компетентных клеток *Escherichia coli* (штамм DH5-alfa). Для отбора трансформированных бактерий, суспензия клеток высевалась на чашки Петри с селективным LB-агаром, содержащим антибиотик ампициллин, индуктор IPTG и индикатор X-gal. Чашки с трансформантами инкубировались в течение 24 ч при температуре 37°C (в термостате LIB-010M, Daihan Labtech), после чего проводился визуальный отбор неокрашенных колоний *E. coli* и пересев на селективную жидкую LB-среду с ампициллином. Инкубацию проводили 24 ч при температуре 37°C и перемешивании в шейкер-инкубаторе LSI-3016A (Daihan Labtech).

Выделение плазмидной ДНК с фрагментами гена 16S рибосомальной РНК из трансформированных клеток проводили с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), концентрацию измеряли на спектрофотометре ScanDrop (Analytik Jena). Секвенсовую реакцию осуществляли по протоколу с набором BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) со следующим составом реакционной смеси: Ready Reaction Premix 2.5X, BigDye® Sequencing Buffer 5X, прямой праймер (3.2 пмоль), матрица ДНК (плазмидная, кол-во в зависимости от концентрации), деионизированная вода (до финального объёма – 20 мкл); для очистки использовали BigDye® X Terminator TM Purification Kit (Life Technologies). Секвенирование проводили с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Life Technologies), полученные последовательности анализировали в программе Sequence Scanner 2 software [Life Technologies Corporation]. Принадлежность фрагментов определяли, сравнивая обработанные и скорректированные последовательности гена 16S рибосомальной РНК с депонированными ранее в базу GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>]. Для учёта брались последовательности, давшие 100% совпадение по нуклеотидному составу с имеющимися в базе.

В итоге выявлено 7 видов бактерий, населяющих слизистую полости рта и зубной налёт испытуемого.

1) *Escherichia fergusonii* – грамотрицательные палочковидные бактерии; патогенными являются некоторые штаммы (выделены из открытых ран, крови пациентов) [Mahapatra et al., 2005; Википедия].

2) *Klebsiella pneumoniae* – капсульные палочковидные грамотрицательные бактерии, возбудители пневмонии и других гнойно-воспалительных процессов [Черкас и др., 1987].

3) *Neisseria subflava* – грамотрицательные диплококки, входят в состав естественной микрофлоры верхних дыхательных путей человека [<https://ru.wikipedia.org>].

4) *Neisseria flavescens* – вид часто встречается на слизистых оболочках дыхательных путей человека, в клинике выявлены единичные случаи вызываемой этим микробом пневмонии и эмпиемы плевры [Huang et al., 2014].

5) *Rothia dentocariosa* – грамположительные палочковидные бактерии, являются частью микрофлоры полости рта человека, вместе с другими бактериями может вызывать кариозные процессы зубов, а также воспалительные процессы ротоглотки [Morris, 2004].

6) *Staphylococcus haemolyticus* – относится к группе коагулазонегативных стафилококков, населяет кожные покровы человека; некоторые штаммы имеют значение в клинике (внутрибольничные инфекции, устойчивые к антибиотикам) [Черкес и др., 1987].

7) *Streptococcus oralis* – грамположительные факультативно-анаэробные бактерии, являются представителями условно-патогенной микрофлоры полости рта человека [Черкес и др., 1987; Википедия].

Авторы статьи выражают благодарность и искреннюю признательность сотрудникам лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Института биологии гена РАН (Москва) Дубилей С.А. и Тихонову А.А. за помощь при отработке методик молекулярного клонирования и предоставленный материал.

#### Список литературы

1. Википедия – свободная энциклопедия – URL: <https://ru.wikipedia.org> (дата обращения: 01.11.14).
2. Ильина Н.А., Касаткина Н.М. Паразитозы кишечника гастроэнтерологических больных // Современные наукоемкие технологии. – 2008. – № 1. – С. 34–37.
3. Касаткина Н.М., Ильина Н.А. Оценка экологических параметров микробиоты кишечника практически здоровых людей и гастроэнтерологических больных при инвазии *Lambliа intestinalis* // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 1. – С. 106–107.
4. Карпеева Е.А., Касаткина Н.М., Ильина Н.А. Бактериальная флора кишечника в зависимости от вида заболевания желудочно-кишечного тракта // III тысячелетие-новый мир: Труды Международного Форума по проблемам науки, техники и образования, 2–5 декабря 2008. – М.: Академия наук о Земле, 2008. – Т.3. – С. 131–133.
5. Красноперова Ю.Ю., Ильина Н.А., Касаткина Н.М., Бугеро Н.В. Микробиология [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие. - М.: Флинта: Наука, 2011. – 144 с.
6. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А. Микробиология: учебник; под ред. Ф.К. Черкеса. – М.: Медицина, 1987. – 512 с.
7. GenBank. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (дата обращения: 01.11.14).
8. Huang L., Ma L., Fan K., Li Y., Xie L., Xia W., Gu B., Liu G. Necrotizing pneumonia and empyema caused by *Neisseria flavescens* infection // Journal of Thoracic Disease. – 2014. – № 6 (5). – P. 553–557.
9. Human Microbiome Project. URL: <http://hmpdacc.org> (дата обращения: 01.11.14).
10. Life Technologies Corporation. URL: <http://www.lifetechnologies.com> (дата обращения: 01.11.14).
11. Mahapatra A., Mahapatra S., Mahapatra A. *Escherichia fergusonii*: an emerging pathogen in South Orissa // Indian journal of medical microbiology. – 2005. – Vol. 23. – № 3. – P. 204.

12. Morris S.K., Nag S., Suh K.N., Evans G.A. Recurrent chronic ambulatory peritoneal dialysis-associated infection due to *Rothia dentocariosa* // Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology. – 2004. – № 15. – P. 171–173.

## ПРОТОТИП УСТРОЙСТВА МОНИТОРИНГА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ARDUINO И 1SHEELD

### A PROTOTYPE OF THE ENVIRONMENTAL MONITORING DEVICE BASED ON ARDUINO AND 1SHEELD

Д.Г. Аникьев<sup>1</sup>, А.В. Цыганов<sup>2</sup>  
D.G. Anikyevev<sup>1</sup>, A.V. Tsyganov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> МАОУ «Физико-математический лицей №38»,  
Российская Федерация, Ульяновск  
Physics and Mathematics Lyceum №38, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: [anikyevev95@mail.ru](mailto:anikyevev95@mail.ru)

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», Российская Федерация, Ульяновск  
Ulyanovsk State Pedagogical University, Russian Federation, Ulyanovsk  
E-mail: [andrew.tsyganov@gmail.com](mailto:andrew.tsyganov@gmail.com)

**Summary.** In this paper we present a prototype of the environmental monitoring device based on the well-known prototyping platform Arduino and a new easily configured shield 1Sheeld which allows Arduino projects to utilize the power of modern smartphones running on Android.

Мониторинг параметров окружающей среды является важной задачей экологического мониторинга. Для решения этой задачи разработан большой арсенал средств, отличающихся техническими характеристиками и стоимостью. В данной статье мы описываем прототип устройства мониторинга параметров окружающей среды на основе популярной платформы прототипирования Arduino [<http://www.arduino.cc>] и недавно анонсированной платы расширения 1Sheeld [<http://www.1sheeld.com>]. Данное устройство отличается простотой конструкции и легкостью программирования, его модификации могут быть легко изготовлены в кружках научно-технического творчества учащихся.

Для изготовления устройства требуются:  
Плата Arduino.

Плата расширения (шилд) 1Sheeld.

Сенсоры для мониторинга параметров окружающей среды, например: датчики температуры, влажности, загазованности и др.

Смартфон под управлением Android (версии 2.3 или выше).

Источник питания для платы Arduino (7-12V).

В качестве платы Arduino могут быть взяты: Arduino Uno, Arduino Mega или их клоны. В нашем проекте использовался китайский клон платы Arduino Uno стоимостью около 8 USD.

Сверху на плату Arduino устанавливается плата расширения 1Sheeld (стоимостью 55-60 USD). Эта плата позволяет с помощью специального приложения, доступного для скачивания в Google Play, получить через интерфейс Bluetooth доступ к различным сенсорам, устройствам и функциям смартфонов на Android, например: GPS, LCD, Wi-Fi, e-mail, Skype и др. Отличительной особенностью данной платы является простота программирования. Например, отправка e-mail через смартфон с выходом в Интернет, выполняется одной командой. Библиотека для работы с 1Sheeld доступна для скачивания с официального сайта проекта и содержит большое количество примеров использования.

В качестве сенсоров для мониторинга окружающей среды в нашем проекте были взяты два датчика: DHT11 – сенсор температуры и влажности, подключаемый к одному из цифровых входов Arduino и MQ-2 – сенсор углеводородных газов, водорода, дыма и др. газов, подключаемый к одному из аналоговых входов. Стоимость каждого датчика – около 2 USD.

Для программирования связки Arduino-1Sheeld-Смартфон достаточно базовых знаний языка программирования C++ и имеющихся в библиотеке примеров. В результате легко может быть сконструировано устройство, позволяющее измерять параметры окружающей среды и передавать их, например, по SMS или на указанный e-mail (рис. 1). Кроме того, текущая версия приложения для 1Sheeld позволяет отправлять сообщения в некоторые популярные сети, например, в Facebook или Twitter.

Ниже приведен полный пример программного кода:



**Рисунок 1.** Внешний вид прототипа устройства и результаты его работы (устройство взаимодействует с телефоном белого цвета и при нажатии на красную кнопку отправляет данные по e-mail на телефон черного цвета).

```
#include <dht.h>
#include <OneSheeld.h>

int dhtPin = 4;
int dhtPowerPin = 3;
int MQPin = A0;
dht DHT;

String s1 = "Temperature = ";
String s2;
String s3 = " C Humidity = ";
String s4;
String s5 = "% MQ-2 value = ";
String s6;
String s = "";

void setup()
{
  Serial.begin(115200);
  pinMode(dhtPowerPin, OUTPUT);
  digitalWrite(dhtPowerPin, HIGH);
  pinMode(dhtPin, INPUT);
  pinMode(MQPin, INPUT);
  OneSheeld.begin();
  PushButton.setOnButtonStatusChange(&onButtonStatusChanged);
}

void loop()
{
}

void onButtonStatusChanged(bool isPressed)
{
  if(isPressed)
  {
    DHT.read11(dhtPin);
    s2 = String(int(DHT.temperature));
    s4 = String(int(DHT.humidity));
    s6 = String(analogRead(MQPin));
    s = s1 + s2 + s3 + s4 + s5 + s6;
    Email.send("anikyev95@mail.ru", "Sensors data", (const char *)
s.c_str());
  }
}
```

#### Список литературы

1. Arduino [Официальный сайт]. URL: <http://www.arduino.cc> (дата обращения: 30.11.2014).
2. 1Sheeld [Официальный сайт]. URL: <http://www.1sheeld.com> (дата обращения: 30.11.2014).

## СПИСОК АВТОРОВ

Айрапетян Ш.А. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Алехина Е.А. – к.п.н., доцент кафедры химии и методики обучения химии ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск  
Аникьев Д.Г. – учащийся МАОУ «Физико-математический лицей №38», Ульяновск  
Антонова Е.И. – д.б.н., профессор кафедры зоологии, директор НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск  
Артемьева Е.А. – д.б.н., профессор кафедры зоологии, с.н.с. НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова», Ульяновск  
Барсукова Т.А. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Барт Н.Г. – к.б.н, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Барышникова Е.И. – к.б.н., с.н.с. ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии  
Батраков В.В. – к.б.н., доцент кафедры зоологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск  
Беззубенкова О.Е. – к.б.н., доцент кафедры ботаники, с.н.с. НИЦ ФППББ, «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск  
Белецкая Е.Я. – к.б.н., доцент кафедры общей биологии ФГБОУ ВПО Омский государственный педагогический университет, Омск  
Брендюк Е.А. – студент, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Васильев Д.А. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Васильева Ю.Б. – к.в.н., доцент микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Викторов Д.А. – к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Винокуров С.Д. – магистрант ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск  
Воротников А.П. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Высокогорский В.Е. – д.м.н., профессор кафедры биохимии Омская медицинская государственная академия, Омск  
Газаев И.Х. – к.б.н., зав. лабораторией, ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии  
Галушко И.С. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Гановичева Е.П. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Гринева Т.А. – аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Дубровская О.А. – студент, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Егошина А.Е. – магистрант ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск  
Ерофеева Л.М. – д.б.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва  
Ефрейторова Е.О. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Ефремов А.Н. – к.б.н., ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск, ЗАО «Проектный институт реконструкции и строительства объектов нефти и газа»  
Золотухин С.Н. – д.б.н., профессор, декан факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Ибрагимов Р.Р. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Игнаткин Д.С. – к.б.н., старший преподаватель кафедры биологии, ветеринарной генетики, паразитологии и экологии, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Казакова А.С. – к. б.н., м.н.с. ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии  
Калабекова Ф.С. – к.б.н., с.н.с., ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии  
Карсакова М.А. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Кафидова А.В. – студент, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Ковалева Е.Н. – к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск  
Колотило А.Н. – к.в.н., кафедра ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» МСХ РФ, Омск  
Колычев Н.М. – д.в.н, профессор кафедры ветеринарной микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» МСХ РФ, Омск  
Комарова А.И. – м.н.с. НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск  
Костина О.М. – аспирант кафедры зоологии, м.н.с. НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск  
Кротова Л.А. – д.с.-х.н., профессор кафедры селекции, генетики и физиологии

растений ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Омск

Куприянова Д.А. – студентка ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск.

Курбанова К.М. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Ленгесова Н.А. – к.б.н., доцент кафедры зоологии, с.н.с. НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Лещёва Н.А. – к.в.н., доцент кафедры ветеринарной микробиологии ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» МСХ РФ, Омск

Ломакин А.А. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Мазина И.А. – студентка ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Макаров Д.К. – аспирант, лаборант-исследователь НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Малоголовкин А.С. – к.б.н., с.н.с., ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Мастиленко А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Михеев В.А. – к.б.н., доцент кафедры зоологии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Мищенко А.В. – к.б.н., доцент кафедры зоологии, с.н.с. НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск.

Мкртчян О.З. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биологии и биологического образования ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск

Молофеева Н.И. – к.б.н., доцент, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Насибуллина Д.М. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Низамова Р.Р. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Новицкий А.А. – д.в.н., профессор кафедры ветеринарной микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» МСХ РФ, Омск

Омарова Д.И. – аспирант ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск

Пирюшова А.Н. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Плешакова В.И. – д.в.н., профессор кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина» МСХ РФ, Омск

Пульчеровская Л.П. – к.б.н., доцент, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Савенко О.И. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Сальников Н.И. – к.б.н. ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии

Семанин А.Г. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Скорик А.С. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Соловьев А.В. – к.б.н., доцент кафедры зоологии, с.н.с. НИЦ ФППББ ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Соловьёв Д.А. – учащийся МОУ Новоульяновская средняя общеобразовательная школа № 1, Новоульяновск

Суркова Е.И. – студентка ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Уралов Н.Р. – студент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Феоктистова Н.А. – к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Фролов Д.А. – к.б.н., доцент кафедры ботаники ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск.

Хамитова Л.Е. – аспирант ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск

Хузина Р.М. – студентка ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Цыганов А.В. – к.ф.-м.н., доцент кафедры высшей математики, зав. лабораторией математического моделирования ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова», Ульяновск

Цыганова Ю.В. – к.ф.-м.н., доцент кафедры математической кибернетики и информатики ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Шестаков А.Г. – к.б.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Шлак О.Ю. – аспирант ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск

Щербина А.А. – аспирант ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск

Diškus A. – D.Sc., Habil.Dr. biosystematics Research Group, Department of Biology, Lithuanian University of Educational Sciences, Vilnius, Lithuania

Remėikis A. – Laboratory of Entomology, Institute of Ecology, Nature Research Centre, Akademijos St. 2, Vilnius LT-08412, Lithuania

Stonis J.R. – Department of Biology, Lithuanian University of Educational Sciences, Studentų St.39, Vilnius LT-08106, Lithuania

## СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие .....	5
-------------------	---

### Секция 1. Морфология

<i>Ерофеева Л.М.</i> Влияние микрогравитации на морфологию тучных клеток в органах дыхания крыс .....	7
<i>Антонова Е.И., Комарова А.И., Костина О.М.</i> Сравнительный анализ морфо-функциональной организации печени животных с различной системой терморегуляции .....	10
<i>Хамитова Л.Е., Антонова Е.И., Мкртчян О.З.</i> Механизмы поддержания тканевого гомеостаза в печени птиц синантропов урбоценозов и гибридных форм кросс-линий кур в эмбриогенезе .....	20
<i>Антонова Е.И., Шпак О.Ю., Мкртчян О.З.</i> Тканевый гомеостаз печени амфибий в ранний восстановительный период после действия гипертермии .....	25

### Секция 2. Биохимия и токсикология

<i>Алехина Е.А., Ефремов А.Н., Егوشيца А.Е.</i> Фенолгликозиды некоторых представителей семейства водокрасовые (Hydrocharitaceae) .....	33
<i>Антонова Е.И., Мкртчян О.З., Высокогорский В.Е.</i> Проявления раннего этапа репаративной регенерации на молекулярном уровне в сравнительном эволюционном ряду позвоночных животных .....	36
<i>Белецкая Е.Я., Кротова Л.А.</i> Селекционная ценность яровых аналогов озимых сортов мягкой пшеницы, полученных с помощью химических мутагенов .....	50
<i>Кротова Л.А., Белецкая Е.Я.</i> Зависимость популяционных признаков мягкой пшеницы от химических мутагенов и сроков хранения обработанных семян .....	53
<i>Антонова Е.И., Мкртчян О.З., Высокогорский В.Е.</i> Индукция протективного действия этанола в условиях сочетанного действия стресс факторов в многократном режиме .....	56

### Секция 3. Клеточные технологии (биотехнология)

<i>Воротников А.П., Молофеева Н.И.</i> РНФ для идентификации <i>Escherichia coli</i> .	63
<i>Воротников А.П., Викторов Д.А.</i> Изучение ферментативных свойств <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	66
<i>Гановичева Е.П., Низамова Р.Р., Насибуллина Д.М., Ибрагимова Р.Р., Галушко И.С., Барт Н.Г.</i> Косметические средства с бактериофагами .....	70
<i>Дубровская О.А., Казакова А.С., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.</i> Тест-система для экспресс-диагностики африканской чумы свиней .....	73
<i>Кафидова А.В., Гринева Т.А.</i> Перспективы применения бактериофагов при псевдомонозе рыб .....	76
<i>Семанин А.Г., Суркова Е.И., Скорик А.С., Васильева Ю.Б., Феоктистова Н.А., Пирюшова А.Н., Уралов Н.Р.</i> Комплексный биопрепарат на основе фагов .	79

<i>Щербина А.А., Малоголовкин А.С., Ковалева Е.Н.</i> Перспективы использования рекомбинантных молекул вируса АЧС .....	82
<i>Батраков В.В., Шестаков А.Г., Васильев Д.А.</i> Комбинированные пробиотические препараты .....	85

### Секция 4. Молекулярная биология

<i>Омарова Д.И., Антонова Е.И., Мкртчян О.З.</i> Реализация путей программируемой клеточной гибели в первый год постэмбриогенеза у рыб вида карп обыкновенный ( <i>Cyprinus carpio</i> L.) .....	88
<i>Айрапетян Ш.А., Барышникова Е.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.</i> Разработка ПЦР для выявления контаминации клеточных культур .....	92
<i>Барсукова Т.А., Воротников А.П., Викторов Д.А., Васильев Д.А.</i> Индикация <i>Flavobacterium psychrophilum</i> методом ПЦР .....	95
<i>Брендюк Е.А., Сальников Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.</i> Полимеразная цепная реакция для детекции вируса чумы мелких жвачных .....	99
<i>Карсакова М.А., Газзаев И.Х., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.</i> Применение ПЦР для выявления вируса африканской чумы свиней в комбикорме ....	102
<i>Курбанова К.М., Калабекова Ф.С., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.</i> ПЦР для идентификации генома рабдовирусов лососевых рыб.....	106
<i>Мастиленко А.В., Васильева Ю.Б., Феоктистова Н.А., Скорик А.С., Суркова Е.И., Семанин А.Г.</i> Подбор праймеров для выявления генов бактерий вида <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	109
<i>Мастиленко А.В., Васильева Ю.Б., Феоктистова Н.А., Скорик А.С., Суркова Е.И., Семанин А.Г.</i> Разработка протокола проведения ПЦР для детекции бактерий вида <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	113

### Секция 5. Проблемы биоразнообразия и экологии

<i>Stonis J.R., Remeikis A., Diškus A.</i> Biodiversity of Central America and Mexico: recent taxonomic additions to the fauna of Nepticuloidea (Insecta, Lepidoptera) .....	117
<i>Соловьев А.В.</i> Молекулярно-генетические исследования представителей рода <i>Narosoideus</i> Matsumura, 1911 (Insecta, Lepidoptera, Limacodidae) фауны России .....	121
<i>Ленгесова Н.А.</i> К познанию комплекса сидячебрюхих (Hymenoptera, Symphyta) Ульяновской области, трофически связанных с растениями сем. розоцветные (Rosaceae) .....	125
<i>Беззубенкова О.Е.</i> Влияние выбросов цементного завода на растительный покров .....	128
<i>Мищенко А.В., Куприянова Д.А.</i> Молекулярно-генетическое исследование наездника <i>Minotetrastichus frontalis</i> (Hymenoptera: Eulophidae) .....	131
<i>Фролов Д.А.</i> Адвентивные виды флоры бассейна реки Свияги и способы их диссеминации .....	135
<i>Галушко И.С., Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П.</i> Детекция бактерий <i>Serratia marcescens</i> .....	141
<i>Ломакин А.А., Мастиленко А.В., Васильева Ю.Б.</i> Чувствительность к антимикробным средствам бактерий вида <i>Bordetella bronchiseptica</i> ....	144

<i>Михеев В.А.</i> Охраняемые виды рыб реки Большой Черемшан (в его среднем и нижнем течении) в пределах Ульяновской области .....	147
<i>Артемяева Е.А., Мищенко А.В., Макаров Д.К., Мазина И.А.</i> Баркодинговые исследования популяции жука-олениа <i>Lucanus cervus</i> в Ульяновской области .....	151
<i>Савенко О.И., Игнаткин Д.С., Ленгесова Н.А.</i> Паразитофауна брюхоногих моллюсков реки Свияги в пределах г. Ульяновска .....	155
<i>Колычев Н.М., Плешакова В.И., Новицкий А.А., Лещёва Н.А., Колотило А.Н.</i> Бактериальные показатели воды, используемой для поения сельскохозяйственных животных .....	159
<b>Секция 6. Математическое моделирование в биоэкологии и биотехнологии</b>	
<i>Винокуров С.Д.</i> 3D-моделирование процессов матричных синтезов .....	165
<i>Цыганова Ю.В.</i> Об одной модели суточной термометрии теплового гомеостаза человека .....	167
<b>Секция 7. Научно-исследовательские работы учащихся</b>	
<i>Мищенко А.В., Хузина Р.М., Соловьёв Д.А.</i> Опыт применения молекулярного клонирования в идентификации бактерий полости рта человека .....	171
<i>Аникьев Д.Г., Цыганов А.В.</i> Прототип устройства мониторинга окружающей среды на основе Arduino и 1Sheild .....	175
<b>Список авторов</b> .....	179

ФГБОУ ВПО «УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Н. УЛЬЯНОВА»

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ  
И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ БИОЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

## ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРИОРИТЕТНЫМ НАПРАВЛЕНИЯМ БИОЭКОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

### МАТЕРИАЛЫ I МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

31 октября 2014 г.

Научное издание

Издательство «Корпорация технологий продвижения».

432012, Россия, г. Ульяновск, ул. Державина, д. 9а, оф. 1. Тел./факс: (8422) 38-79-08. E-mail: ktpbook@mail.ru.

Тираж 200 экз.