

ISSN 1997-1389 (Print)
ISSN 2313-5530 (Online)

**Журнал Сибирского
федерального университета
Биология**

**Journal of Siberian
Federal University
Biology**

2022 15 (3)

ISSN 1997-1389 (Print)
ISSN 2313-5530 (Online)

2022 15(3)

Журнал Сибирского федерального университета Биология

Journal of Siberian Federal University Biology

Издание индексируется Scopus (Elsevier), «Russian Science Citation Index» и «Zoological Record» на платформе «Web of Science» (Clarivate Analytics), Российским индексом научного цитирования (НЭБ), представлено в международных и российских информационных базах: Ulrich's periodicals directory, ProQuest, EBSCO (США), Google Scholar, Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI), DOAJ, КиберЛенинка.

Включено в список Высшей аттестационной комиссии «Рецензируемые научные издания, входящие в международные реферативные базы данных и системы цитирования».

**Журнал Сибирского федерального университета. Биология.
Journal of Siberian Federal University. Biology.**

Учредитель: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Главный редактор: *Е.С.Кравчук*. Редактор *И.А.Вейсиг*. Корректор *С.В.Хазаржан*.
Компьютерная верстка *Е.В. Гревцовой*

№ 3. 30.09.2022. Индекс: 42325. Тираж: 1000 экз.

Свободная цена

Адрес редакции и издательства: 660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 79, оф. 32-03.

Отпечатано в типографии Издательства БИК СФУ
660041 г. Красноярск, пр. Свободный, 82а.

*Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-28725 от 29.06.2007 г.,
выданное Федеральной службой по надзору в сфере массовых коммуникаций,
связи и охраны культурного наследия.*

<http://journal.sfu-kras.ru>

Подписано в печать 24.09.2022. Формат 84x108/16. Усл. печ. л. 11,7.

Уч.-изд. л. 11,2. Бумага тип. Печать офсетная. Тираж 1000 экз. Заказ № 15835.

Возрастная маркировка в соответствии с Федеральным законом № 436-ФЗ: 16+

CHIEF EDITOR

Michail Gladyshev, Corresponding Member of RAS, Professor, Institute of Biophysics SB RAS, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia.

SCIENCE EDITOR

Elena Kravchuk, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

EDITORIAL BOARD

- Sergey Bartsev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Andrey Degermendzhy, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Nikolay Gaevsky, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Viktor Glupov, Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk, Russia
- Malcolm Hughes, University of Arizona, Tucson, USA
- Mikhail Karpinsky, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography, Moscow, Russia
- Valentina Kratasyuk, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- John Lee, University of Georgia, Athens, USA
- Elena Muratova, Institute of Forest SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Vitaliy Semenchenko, Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Belarus
- Nadezhda Sushchik, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Sabu Thomas, Mahatma Gandhi University, Kottayam, India
- Aristidis Tsatsakis, University of Crete, Heraklion, Greece
- Eugene Vaganov, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia
- Tatiana Volova, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia
- Egor Zadereev, Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk, Russia

CONTENTS

Olga V. Voropaeva, Galina G. Borisova, Maria G. Maleva, Anastasia V. Podstavkina, Alexander A. Ermoshin, Anastasia S. Tugbaeva and Elena I. Filimonova Plant Growth Promoting Activity and Metal Tolerance of Bacteria Isolated from Rhizosphere of the Orchid <i>Epipactis atrorubens</i> Growing on Serpentine Substrates of the Middle Urals	297
Gulnaz F. Rafikova, Elena V. Kuzina, Lidia B. Vysotskaya, Tatiana N. Arkhipova, Tatiana Yu. Korshunova, Darya V. Chetverikova, Margarita D. Bakaeva, Guzel R. Kudoyarova and Sergey P. Chetverikov The Influence of Hydrocarbon-Oxidizing Auxin-Producing Bacteria on the Growth, Biochemical Parameters, and Hormonal Status of Barley Plants in the Process of Bioremediation of Oil-Contaminated Soil	314
Natalya A. Tyulkova and Vladimir S. Bondar Content of Lipid Peroxydation Products, Activity of Antioxidant Enzymes, and Intensity of Light Emission of Basidiomycete <i>Neonothopanus nambi</i> under Stress after Mechanical Damage	333
Elena M. Serba, Lyubov V. Rimareva, Van Chi Tran, Marina B. Overchenko, Nadezhda I. Ignatova, Anzhelika A. Pavlova and Irina M. Abramova The Influence of the Sorghum Grain Composition on the Efficiency of its Microbial Conversion to Ethanol and Lysine	347
Anzhelika A. Kolmakova and Vladimir I. Kolmakov Amino Acid Composition of Prospective Food Items for Rainbow Trout Aquaculture in Krasnoyarsk Region	363
Kirill N. Stoyanov, Olesia N. Makhutova, Konstantin G. Malyshevsky, Elena V. Borisova, Nadezhda N. Sushchik, Anzhelika A. Kolmakova, Vasiliy N. Morgun and Michail I. Gladyshev Fatty Acid Content and Composition of Fly Larvae <i>Lucilia sericata</i> (Family Calliphoridae) Grown on Diets with Different Content of Polyunsaturated Fatty Acids and the Amino Acid Composition of this Species	378
Vladislav Yu. Buslaev, Lyudmila V. Matskova, Varvara I. Minina and Vladimir G. Druzhinin Analysis of the Microbiome of Human Lungs and Respiratory System in Lung Disorders: a Review	396
Alexander A. Bogatikov, Konstantin G. Dobretsov, Marina V. Melikhova, Mikhail A. Rozhko, Natalia V. Lapina, Sergey V. Stolyar, Roman N. Yaroslavtsev, Oleg A. Bayukov, Anna V. Tyumentseva, Elena D. Nikolaeva, Ekaterina S. Tyutrina and Evgenii V. Zinovev A New Method for Treating Burn Wounds Using Targeted Delivery of Medicinal Substances by Magnetic Nanocarrier (Experimental Part)	422

СОДЕРЖАНИЕ

О. В. Воропаева, Г. Г. Борисова, М. Г. Малева, А. В. Подставкаина, А. А. Ермошин, А. С. Тугбаева, Е. И. Филимонова Ростстимулирующая активность и металлоустойчивость изолятов бактерий из ризосферы орхидеи <i>Epipactis atrorubens</i> , произрастающей на серпентинитовых субстратах Среднего Урала	297
Г. Ф. Рафикова, Е. В. Кузина, Л. Б. Высоцкая, Т. Н. Архипова, Т. Ю. Коршунова, Д. В. Четверикова, М. Д. Бакаева, Г. Р. Кудоярова, С. П. Четвериков Влияние углеводородокисляющих бактерий, продуцирующих ауксины, на рост, биохимические показатели и гормональный статус растений ячменя в процессе биоремедиации нефтезагрязненной почвы.....	314
Н. А. Тюлькова, В. С. Бондарь Содержание продуктов перекисного окисления липидов, активность антиоксидантных ферментов и интенсивность световой эмиссии базидиомицета <i>Neonothopanus nambi</i> при стрессе после механического повреждения	333
Е. М. Серба, Л. В. Римарева, В. Т. Чан, М. Б. Оверченко, Н. И. Игнатова, А. А. Павлова, И. М. Абрамова Влияние особенностей состава зерна сорго на эффективность его микробной конверсии в этанол и лизин	347
А. А. Колмакова, В. И. Колмаков Состав аминокислот в перспективных компонентах питания радужной форели в условиях аквакультуры Красноярского края.....	363
К. Н. Стоянов, О. Н. Махутова, К. Г. Малышевский, Е. В. Борисова, Н. Н. Сущик, А. А. Колмакова, В. Н. Моргун, М. И. Гладышев Состав и содержание жирных кислот в личинках мух <i>Lucilia sericata</i> (сем. Calliphoridae), выращенных на кормах с разным содержанием полиненасыщенных жирных кислот, и особенности их аминокислотного состава.....	378
В. Ю. Буслаев, Л. В. Мацкова, В. И. Минина, В. Г. Дружинин Анализ микробиоты лёгких и респираторного тракта человека при заболеваниях легочной системы (обзор)	396
А. А. Богатиков, К. Г. Добрецов, М. В. Мелихова, М. А. Рожко, Н. В. Лапина, С. В. Столяр, Р. Н. Ярославцев, О. А. Баюков, А. В. Тюменцева, Е. Д. Николаева, Е. С. Тютрина, Е. В. Зиновьев Новый способ лечения ожоговых ран с помощью адресной доставки лекарственных веществ магнитным наноносителем (экспериментальная часть).....	422

DOI 10.17516/1997-1389-0389

EDN: CITDOK

УДК 58.071:579.222

**Plant Growth Promoting Activity and Metal Tolerance
of Bacteria Isolated from Rhizosphere
of the Orchid *Epipactis atrorubens* Growing
on Serpentine Substrates of the Middle Urals**

**Olga V. Voropaeva^a,
Galina G. Borisova^a, Maria G. Maleva^{*a},
Anastasia V. Podstavkina^a, Alexander A. Ermoshin^{a,b},
Anastasia S. Tugbaeva^a and Elena I. Filimonova^a**

^a*Ural Federal University
named after the first President of Russia B. N. Yeltsin
Ekaterinburg, Russian Federation*

^b*Inner Mongolia Academy of Agriculture
and Animal Husbandry Science
Hohhot, China*

Received 17.05.2022, received in revised form 14.07.2022, accepted 16.08.2022

Abstract. The article presents data obtained in the study of bacteria isolated from the rhizosphere of the orchid *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser. Analysis was carried out to compare some morphological, physiological, and biochemical characteristics of plant rhizobacteria growing on serpentine rocks in two biotopes: in the natural forest community (control habitat) and on the asbestos mine dump (the Sverdlovsk region, Middle Urals). An assessment of the plant growth promoting (PGP) activity of the isolated strains did not show significant differences in the ability of rhizobacteria to synthesize indol-3-acetic acid (IAA) and solubilize phosphates between the study sites. However, the proportion of isolates capable of nitrogen fixation was higher in the rhizosphere of *E. atrorubens* growing on the dump compared to the control habitat. The tolerance of isolates to heavy metals was assessed by the maximum metal concentration (400, 600, and 1000 mg/L, respectively, for Ni, Cu,

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: maria.maleva@mail.ru

ORCID: 0000-0002-5055-797X (Voropaeva O.); 0000-0001-6663-9948 (Borisova G.); 0000-0003-1686-6071 (Maleva M.); 0000-0002-1530-5291 (Podstavkina A.); 0000-0003-2784-4898 (Ermoshin A.); 0000-0001-9231-3650 (Tugbaeva A.); 0000-0001-6937-0139 (Filimonova E.)

and Zn) at which bacterial growth was observed. Rhizobacteria from the dump were found to be more resistant to elevated concentrations of metals compared to their counterparts from the natural forest community. The molecular genetic analysis of isolates with the highest PGP-activity (IAA >1.0 mg/L; PO₄³⁻ >50.0 mg/L) revealed that most of the *E. atrorubens* rhizobacteria in both habitats belonged to the genera *Buttiauxella* and *Pseudomonas*. In model experiments, the PGP ability of four selected strains was tested on zinnia seeds. Seed inoculation with *Pseudomonas* sp. and *Buttiauxella* sp. did not have any significant effect on their germination; however, *Buttiauxella* sp. contributed to the increase in the length of seedlings compared with the control (by 25 %, on average). It has been suggested that the selected isolates of *E. atrorubens* rhizobacteria, due to their growth promoting activity and metal tolerance, can facilitate naturalization of the orchid in an industrially disturbed area.

Keywords: Orchidaceae, dark-red helleborine, rhizospheric bacteria, serpentine dumps, technogenic substrates, heavy metals, plant growth promoting activity, 16S rRNA gene sequencing

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR and the Government of the Sverdlovsk Region (Project number 20-44-660011) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of state task of the Ural Federal University (FEUZ-2020-0057).

Citation: Voropaeva O. V., Borisova G. G., Maleva M. G., Podstavkina A. V., Ermoshin A. A., Tugbaeva A. S., Filimonova E. I. Plant growth promoting activity and metal tolerance of bacteria isolated from rhizosphere of the orchid *Epipactis atrorubens* growing on serpentine substrates of the Middle Urals. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(3), 297–313. DOI: 10.17516/1997-1389-0389



Ростстимулирующая активность и металлоустойчивость изолятов бактерий из ризосферы орхидеи *Epipactis atrorubens*, произрастающей на серпентинитовых субстратах Среднего Урала

**О. В. Воропаева^а, Г. Г. Борисова^а,
М. Г. Малева^а, А. В. Подставкина^а,
А. А. Ермошин^{а, б}, А. С. Тугбаева^а, Е. И. Филимонова^а**

^аУральский федеральный университет
им. первого Президента России Б. Н. Ельцина
Российская Федерация, Екатеринбург

^бАкадемия сельского хозяйства
и животноводства Внутренней Монголии
Китай, Хух-Хото

Аннотация. В статье представлены данные, полученные при изучении бактерий, выделенных из ризосферы орхидеи *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser. Проведен сравнительный анализ некоторых морфологических, физиологических и биохимических характеристик ризобактерий

растений, произрастающих в двух биотопах на серпентинитовых породах: в естественном лесном фитоценозе (фоновый участок) и на отвале после добычи асбеста (Свердловская область, Средний Урал). Оценка ростстимулирующей (PGP) активности выделенных штаммов не показала достоверных различий между исследованными участками по способности ризобактерий к синтезу индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и солюбилизации фосфатов. Однако доля изолятов, способных к азотфиксации, была выше в ризосфере *E. atrorubens*, произрастающего на отвале, по сравнению с фоновым местообитанием. Устойчивость изолятов к тяжелым металлам оценивали по максимальной концентрации металла (400, 600 и 1000 мг/л соответственно для Ni, Cu и Zn), при которой отмечался рост бактерий. Показано, что ризобактерии с отвала оказались более устойчивыми к повышенным концентрациям металлов по сравнению с естественным лесным фитоценозом. На основе молекулярно-генетического анализа изолятов с наиболее выраженной PGP-активностью (ИУК >1,0 мг/л; PO₄³⁻ >50,0 мг/л) обнаружено сходство между изученными местообитаниями по родовой принадлежности ризобактерий *E. atrorubens*: выделенные штаммы принадлежали преимущественно к родам *Buttiauxella* и *Pseudomonas*. В модельных экспериментах протестирована ростстимулирующая способность четырех отобранных штаммов на семенах циннии. Инокуляция семян *Pseudomonas* sp. и *Buttiauxella* sp. не оказывала значимого влияния на их всхожесть, однако *Buttiauxella* sp. способствовала увеличению длины проростков в сравнении с контролем (в среднем на 25 %). Сделано предположение, что отобранные изоляты ризобактерий *E. atrorubens*, благодаря их ростстимулирующей активности и металлоустойчивости, могут способствовать натурализации орхидеи на техногенно нарушенной территории.

Ключевые слова: Orchidaceae, дремлик темно-красный, ризосферные бактерии, серпентинитовые отвалы, техногенные субстраты, тяжелые металлы, ростстимулирующая активность, секвенирование гена 16S рНК.

Благодарности: Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ и Правительства Свердловской области (научный проект номер 20-44-660011) и Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания Уральского федерального университета (FEUZ-2020-0057).

Цитирование: Воропаева, О.В. Ростстимулирующая активность и металлоустойчивость изолятов бактерий из ризосферы орхидеи *Epipactis atrorubens*, произрастающей на серпентинитовых субстратах Среднего Урала / О.В. Воропаева, Г.Г. Борисова, М.Г. Малева, А.В. Подставкаина, А.А. Ермошин, А.С. Тугбаева, Е.И. Филимонова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 297–313. DOI: 10.17516/1997-1389-0389

Введение

Изменение естественных местообитаний и сокращение ареалов многих представителей семейства Orchidaceae Juss. влечет за собой уменьшение их численности, а порой и полное уничтожение (Swarts, Dixon, 2009). Как правило, виды этого семейства представлены

малочисленными популяциями, приуроченными к определенным экологическим нишам, характеризуются длительным циклом возобновления, низкой конкурентоспособностью (Мамаев и др., 2004; Vakhrameeva et al., 2008). Сокращению численности популяций орхидей также способствует сбор высококоде-

коративных растений на букеты и заготовка подземных и надземных органов в качестве лекарственного сырья (Перебора, 2011).

Вместе с тем в последние десятилетия обнаружено, что субстраты, сформировавшиеся в результате деятельности предприятий добывающей и перерабатывающей промышленности, на ранних стадиях сукцессии могут заселяться некоторыми редкими видами орхидей (Jurkiewicz et al., 2001; Adamowski, 2006; Филимонова и др., 2014; Chibrik et al., 2016; Rewicz et al., 2017; Filimonova et al., 2019).

Особый интерес представляет популяция редкой на Урале орхидеи *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (дремлик темно-красный), обнаруженная на серпентинитовом отвале после добычи асбеста (Filimonova et al., 2019; 2020). Дремлик темно-красный – европейско-западно-сибирский вид, занесенный в Красные книги 35 регионов России, включая Красную книгу Свердловской области (Красная книга..., 2018). Эта орхидея встречается преимущественно на известняковых скальных обнажениях по берегам рек и на сухих облепленных каменистых (известняковых, доломитовых, реже гранитных) склонах в хребтовой части Урала (Мамаев и др., 2004). Как ксеро-мезофит и кальцефил *E. atrorubens* оказался способным заселять различные каменистые промышленные отвалы и карьеры, образованные при разработке месторождений асбеста, бурого угля, талька, известняка и др. (Filimonova et al., 2020).

Субстраты, сформированные на серпентинитовых породах, обычно неблагоприятны для роста растений из-за своих физических и химических свойств. Они отличаются низким содержанием азота, фосфора, калия, кальция, высоким содержанием магния (Djordjevic et al., 2016). Сдвиг соотношения Mg: Ca в пользу Mg негативно сказывается на растениях, особенно в условиях избытка

ионов таких тяжелых металлов (ТМ), как железо, никель, хром и кобальт (Rajakaruna, Boyd, 2014).

Особую актуальность для разработки эффективных мер по сохранению локальных популяций редких видов орхидей представляет изучение их консортивных связей с почвенными микроорганизмами. К настоящему времени доказана положительная роль микоризы в адаптации орхидных к малопродуктивным субстратам, почвам с избыточным количеством металлов и другим неблагоприятным эдафическим условиям (Jurkiewicz et al., 2001; Kulikov, Filippov, 2001; Rasmussen, 2002; Smith, Read, 2008).

Почвенные бактерии, наряду с микромицетами, являются важнейшими компонентами системы симбиотических отношений растений сем. Orchidaceae с микроорганизмами (Herrera et al., 2022). Известно, что многие эндофитные и ризосферные бактерии обладают способностью стимулировать рост растений (PGP – от англ. «Plant Growth Promoting») с помощью различных механизмов, таких как производство фитогормонов, хелатирование железа сидерофорами, образование органических кислот, солубилизация фосфатов, индукция антиоксидантных ферментов и др. (Боронин, 1998; Vessey, 2003; Lugtenberg, Kamilova, 2009; Rana et al., 2011; Rajkumar et al., 2017; Kumar et al., 2021a; 2021b).

К настоящему времени бактериальная микрофлора орхидей, которая, возможно, наряду с микоризой способствует их адаптации к неблагоприятным условиям, изучена недостаточно. Встречаются отдельные работы (Bauman, Otero, 2006; Шеховцова и др., 2010; Перебора, 2011; Herrera et al., 2022), где приводятся сведения о сообществах почвенных микроорганизмов в местообитаниях орхидных и показано их функциональное и таксономическое разнообразие. Доказана

способность ассоциированных с орхидеями бактерий синтезировать ауксины и проявлять другие PGP-свойства (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2005; 2007; Faria et al., 2013; Jakubská-Busse et al., 2021; Herrera et al., 2022). Однако данные о способности ризосферных бактерий улучшать рост орхидных и повышать их жизнеспособность в условиях абиотического стресса являются фрагментарными. Между тем изучение этих аспектов является научной основой для понимания механизмов устойчивости орхидей в техногенно нарушенных местообитаниях.

Цель исследования – оценка морфологических характеристик, PGP-активности и металлотолерантности культивируемых изолятов бактерий из ризосферы орхидеи *E. atrorubens*, произрастающей на серпентинитовых породах (естественный лесной фитоценоз и отвал после добычи асбеста), и определение таксономической принадлежности наиболее эффективных штаммов.

Материал и методы

Объектами исследования были бактерии, выделенные из ризосферы *E. atrorubens*. Для исследования было выбрано два участка, субстраты которых сформированы на серпентинитовых породах: S-1 (57°45'42.93"N, 60°12'52.82"E), представленный естественным лесным массивом (сосновый лес между селом Шиловка и поселком Новоасбест, Горноуральский городской округ), и S-2 (57°44'54.78"N, 60°12'37.55"E) – отвал вскрышных пород после добычи асбеста (Шиловское месторождение асбеста, п. Новоасбест).

В выбранных участках проводили отбор материала (почва ризосферы вместе с растениями) для выделения штаммов ризобактерий, их тестирования на PGP-активность и металлотолерантность и проведения молекулярно-генетической идентификации бактериальных

изолятов с наиболее выраженными PGP-свойствами. Растения *E. atrorubens* (по 3 генеративных особи из каждого биотопа) выкапывали вместе с субстратом в период цветения (середина июля 2020 г.), помещали в стерильные зип-пакеты и доставляли в лабораторию. Параллельно с микробиологическими исследованиями проводили оценку физико-химических свойств ризосферной почвы.

Величину pH и удельную электропроводность определяли в почвенно-водной суспензии в соотношении 1:2,5 (почва: деионизированная вода) с помощью портативного pH-метра/кондуктометра (Hanna Instruments GmbH, Graz, Австрия). Гранулометрический анализ субстратов выполняли с использованием сит стандартным методом (Вадюнина, Корчагина, 1986). Содержание ТМ в субстратах определяли при помощи атомно-абсорбционной спектроскопии на Varian AA240FS (Varian Australia Pty Ltd, Австралия) после озоления 70 %-ной азотной кислотой.

Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в образцах ризосферной почвы определяли высевом на твердую питательную среду Лурия-Бертани (LB) и выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г сухого веса (Нетрусов и др., 2005).

Оценку способности культивируемых изолятов ризобактерий стимулировать рост растений проводили путем их тестирования на способность к азотфиксации, синтезу индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и солиubilизации фосфатов.

Для определения способности выделенных ризобактерий к фиксации молекулярного азота изоляты инкубировали на плотной среде Эшби в течение 3–5 суток при температуре 28 °С. В качестве контроля использовали среду Эшби с добавлением нитратного азота (Kumar et al., 2013).

Для оценки продукции ИУК использовали методику Brice et al. (1991) с модифицированным бульоном LB. Культуру бактерий (10^8 КОЕ/мл) инокулировали в бульон LB с добавлением L-триптофана (200 мкг/мл) и культивировали при 28 °C при 160 об./мин. Через 7 суток из культуры отбирали 1 мл, переносили в пробирку типа Eppendorf и центрифугировали при 10000 g в течение 6 мин. К 100 мкл супернатанта добавляли 100 мкл реактива Сальковского (20 мл 35 % HClO_4 и 10 мл 0,5 M FeCl_3), инкубировали в темноте в течение 30 мин и измеряли оптическую плотность при 530 нм на планшетном спектрофотометре (Infinite M200 PRO, Tecan, Австрия). Способность к синтезу ИУК из L-триптофана определяли по калибровочной кривой, построенной на основе стандартного раствора данного гормона (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия).

Для оценки способности бактерий к солюбилизации фосфатов был модифицирован метод, предложенный ранее Ribeiro, Cardoso (2012). Молодые культуры бактерий (10^8 КОЕ/мл) инокулировали в среду NBRIP ("National Botanical Research Institute's phosphate growth medium") с pH $7,1 \pm 0,2$ и инкубировали при 28 °C в течение 192 ч при 160 об./мин. Для определения количества растворенных фосфатов из культуры отбирали 1 мл, переносили в пробирку типа Eppendorf и центрифугировали при 10000 g в течение 6 мин. В каждую лунку планшета вносили 29 мкл супернатанта вместе с 114 мкл деионизированной воды Millipore (система Milli-Q, Millipore, Франция) и 57 мкл ванадий-молибденового реагента. Образцы инкубировали в течение 10 мин и измеряли оптическую плотность при 420 нм. Параллельно культивировали контрольные образцы (без добавления бактерий). Способность к солюбилизации фосфатов оценивали по калибровочной кривой, построен-

ной с использованием стандартного раствора дигидроортофосфата калия (KH_2PO_4).

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) изоляты выращивали с возрастающими концентрациями ТМ (для Cu: от 200 до 600; Ni: от 300 до 400; Zn: от 100 до 2000 мг/л) на жидкой среде LB в течение 5 дней при 28 °C (Rajkumar et al., 2013). Все используемые растворы ТМ готовили с использованием деионизированной воды Millipore. Контрольные пробирки были подготовлены без добавления металлов.

В целях определения родовой принадлежности изолятов проводили их молекулярно-генетическую идентификацию. ДНК из жидких культур изолированных колоний выделяли с помощью набора для экстрагирования бактериальной геномной ДНК фирмы ООО «Диаэм» (3318.0250) на спин-колонках согласно инструкции производителя. Концентрацию и наличие примесей в выделенной ДНК определяли спектрофотометрическим методом при 260 и 280 нм (Infinite M200 PRO, Tecan, Австрия). Для амплификации генов 16S рРНК использовали в качестве матрицы 10 нг тотальной ДНК, набор 16S Barcoding Kit (SQK-16S 024, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) и LongAmp Hot Start Taq 2 × Master Mix (NEB, Великобритания), следуя протоколу производителя. Условия амплификации: начальная денатурация при 95 °C в течение 1 мин; 25 циклов: денатурация при 95 °C в течение 20 сек, отжиг праймеров при 55 °C в течение 30 сек и синтез цепи при 65 °C в течение 2 мин; окончательное удлинение цепи при 65 °C в течение 5 мин (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, США). ПЦР-продукт очищали с помощью AMPure XP (Beckman Coulter, США) и использовали для подготовки библиотеки для секвенирования (SQK-16S 024, Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Секвенирование проводили на приборе

GridION Mk1 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) в проточной кювете R 9.4 (FLO-MIN 106D; Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Первичную обработку данных проводили в программном обеспечении MINKNOW ver. 21.05.8 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Данные последовательностей в формате FAST5 были преобразованы в файлы формата FASTQ с помощью программного обеспечения Guppy ver. 5.0.11 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) со средним показателем качества прочтения >7. Систематическую принадлежность бактерий определяли на основе таксономической базы данных NCBI с использованием программного обеспечения EPI2ME Fastq 16S ver. 3.3.0 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). В процессе анализа из прочтений были удалены последовательности адаптера и штрих-кода, минимальная длина идентифицированных фрагментов составляла 1400 п.н.

На основе количественного определения у изолятов способности к синтезу ИУК и солюбилизации фосфатов было отобрано 4 штамма с наиболее выраженной ростстимулирующей активностью для тестирования на растениях. Для оценки их влияния на всхожесть семян и длину проростков был проведен эксперимент, в котором использовали семена циннии изящной (*Zinnia elegans* Jacq.), сорт «крупноцветковая винно-красная», агрофирма «Аэлита». Семена стерилизовали стандартным методом, выдерживая 1 мин в 70 %-ном этаноле, после чего в течение 15 мин обрабатывали раствором гипохлорита натрия (0,2 % активного хлора) и трижды отмывали стерильной дистиллированной водой. Далее стерильные семена раскладывали в ламинар-боксе в чашки Петри (диаметр 10 см), в которые предварительно было помещено два слоя стерильной фильтровальной бумаги и добав-

лены тестируемые растворы в объеме 10 мл. Контролем служила дистиллированная вода. В опытных вариантах использовали суспензии культур бактерий, которые выращивали на питательной среде LB в течение 3 суток при температуре 27 °С и постоянном перемешивании (160 об/мин.). Выросшие культуры бактерий центрифугировали, после чего осадок промывали дистиллированной водой и повторно центрифугировали. После промывки бактерии доводили до концентрации $(1-7) \times 10^7$ клеток/мл и добавляли к семенам циннии. Чашки инкубировали при фотопериоде 16:8 (день: ночь), интенсивности светового потока 250 мкМ фотонов/(м² сек), относительной влажности 60 % и температуре 27 °С. В каждую чашку помещали по 20 семян; каждый вариант опыта проводили в 3-кратной повторности. На 7 сутки определяли всхожесть семян и измеряли длину растений (от кончика корня до верхушки проростка).

Измерения морфологических и физиологических параметров выделенных изолятов ризобактерий проводили в 3–11-кратной биологической повторности. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ MS Excel'2016 и Statistica'8. Для оценки достоверности различий между исследуемыми участками использовали непараметрический критерий Манна–Уитни при $p < 0,05$. В таблицах и на рис. 3 представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки (SE); разными латинскими буквами отмечены достоверные различия между вариантами.

Результаты и обсуждение

Эдафические факторы оказывают значительное влияние на сообщества ассоциативных микроорганизмов (Белимов, 2012; Herrera et al., 2022), поэтому представляется целесообразным охарактеризовать основные

физико-химические свойства изученных субстратов.

Субстраты изученных участков отличались по гранулометрическому и химическому составу. Почвы на S-1 – горные лесные бурые, легкосуглинистые. В гранулометрическом составе преобладала фракция мелкозема, включающая песок, пыль и др. В составе скелетной части почти равные доли имели гравий и щебень. Субстрат отвала серпентинитовых пород (S-2) содержал меньше мелкозема, но больше гравия и щебня (табл. 1). Кроме того, он характеризовался большей щелочностью по сравнению с S-1. При этом удельная электропроводность почвенного субстрата на участке S-1 почти в 1,5 раза превышала соответствующие значения для S-2 (табл. 1).

Количественная оценка микроорганизмов в субстратах из ризосферы *E. atrorubens* показала, что КМАФАнМ на изученных участках было примерно одинаковым (табл. 1). По отношению к молекулярному кислороду на обоих участках аэробные бактерии доминировали над факультативными анаэробами.

Исследования показали, что субстрат отвала серпентинитовых пород (S-2) отличался повышенным валовым содержанием магния, никеля, хрома, меди и кобальта (205405, 1618, 1263, 120 и 60 мг/кг соответственно). В почве

естественного лесного массива (S-1) концентрация этих металлов была в среднем в 3 раза ниже. При этом содержание доступных форм кальция и таких важных для растений микроэлементов, как марганец, цинк и медь, на отвале было ниже, чем в естественном фитоценозе. Соотношение валового содержания Mg к Ca в субстрате отвала составляло почти 15, в то время как в лесном фитоценозе – около 4.

Для изучения особенностей бактериальной микрофлоры из ризосферной почвы *E. atrorubens* в лесном фитоценозе (S-1) было выделено 37 штаммов ризосферных бактерий, представленных преимущественно одиночными грамотрицательными палочками разной длины (81 %). Из ризосферной почвы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале (S-2), было выделено 22 штамма ризобактерий, среди которых также преобладали грамотрицательные одиночные, в основном подвижные, палочки (82 %). По культуральным признакам на твердой питательной среде можно было выделить круглые колонии (71 %), а также круглые с фестончатым краем (13 %), с валиком по краю (11 %) и складчатые (5 %) (рис. 1).

Важной характеристикой почвенных микроорганизмов, способствующей росту растений, является способность к фиксации атмосферного азота. Это свойство имеет особую значимость для растений, произрастающих

Таблица 1. Физико-химические характеристики исследованных субстратов и количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ)

Table 1. Physicochemical characteristics of the substrates and the number of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (QMAFAnM)

Участок	рН*	Удельная электропроводность, мкСм/см*	Щебень, %	Гравий, %	Мелкозем: песок, пыль, глина, %	КМАФАнМ, КОЕ/г сухой почвы
			> 10 мм	10–2 мм	< 2 мм	
S-1	7,37 ± 0,01a	166,80 ± 4,37a	7–10	8–10	80–83	6,1×10 ⁴
S-2	8,23 ± 0,01b	117,00 ± 2,63b	26	30	44	6,8×10 ⁴

Примечание: *приведены средние арифметические значения ± стандартные ошибки (SE); разными буквами отмечены достоверные различия между исследуемыми участками при $p < 0,05$ ($n = 3$).

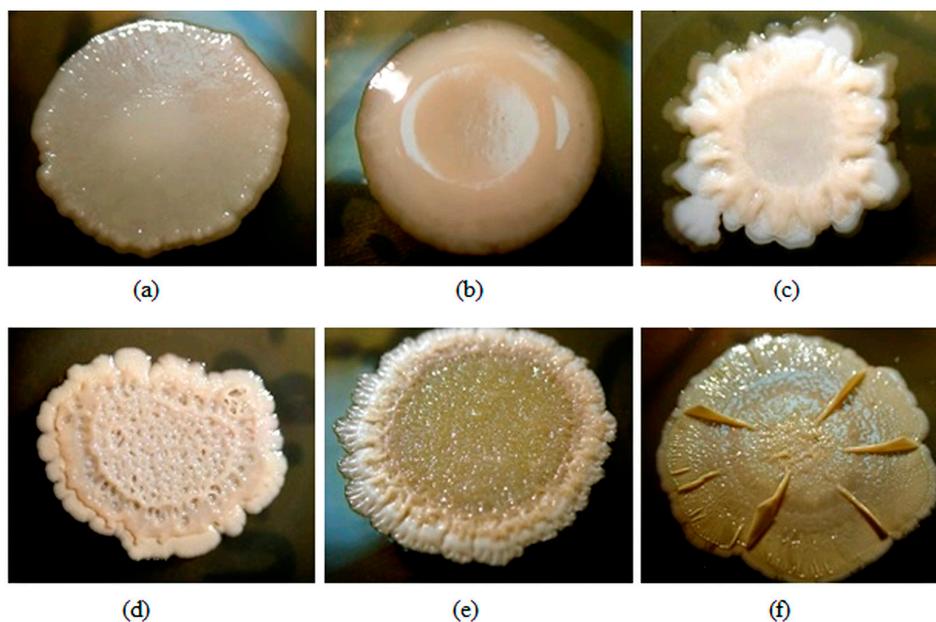


Рис. 1. Формы выделенных колоний: (a) круглая; (b) круглая с валиком по краю; (c–e) круглая с фестончатым краем; (f) круглая, складчатая

Fig. 1. The shapes of the isolated colonies: (a) round; (b) round with a ridge along the edge; (c–e) round with scalloped edge; (f) round, folded

на малопродуктивных субстратах с низким содержанием доступного азота. Установлено, что большинство бактерий (около 90 %), выделенных из ризосферы *E. atrorubens* на отвале (S-2), были способны к азотфиксации, в то время как среди ризобактерий, выделенных в естественном фитоценозе (S-1), такой способностью обладали лишь 66 %.

Большинство выделенных штаммов ризобактерий в той или иной степени продемонстрировало способность к синтезу ИУК. На жидкой питательной среде, содержащей *L*-триптофан, бактерии на обоих участках синтезировали ИУК примерно в равных долях: 92 % на S-1 и 96 % на S-2. Как известно, ауксины влияют на деление и дифференцировку клеток, прорастание семян и способствуют образованию боковых и придаточных корней. Удлинение корней увеличивает площадь поверхности корня, тем самым увеличивая поглощение питательных веществ,

а, следовательно, способствует обеспечению растений необходимыми нутриентами (Tsavkelova et al., 2007; Sokolova et al., 2011). Способность некоторых бактерий, ассоциированных с орхидеями, к синтезу ИУК была отмечена и другими авторами (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2005; 2007; Altinkaynak, Ozkoc, 2020; Jakubska-Busse et al., 2021).

Одним из важнейших макроэлементов для растений является фосфор. Он присутствует в почве в форме минералов, органических соединений и неорганических солей. Значительная часть фосфатов недоступна для растений, поэтому способность некоторых почвенных микроорганизмов солюбилизировать фосфаты является важной характеристикой, способствующей росту и жизнедеятельности растений (Herrera et al., 2022). Обычно процесс солюбилизации является результатом действия низкомолекулярных органических кислот, которые выделяются бактериями

и способны растворять минеральные соединения фосфора. Увеличение количества доступных фосфатов может также наблюдаться вследствие активности бактериальных гидролитических ферментов (фосфатаз), ускоряющих расщепление органических соединений фосфора (Боронин, 1998; Herrera et al., 2022).

Способность к солюбилизации фосфатов была характерна для подавляющего числа штаммов, выделенных из почвенной ризосферы *E. atrorubens*, что, очевидно, благоприятствовало натурализации этой орхидеи на малоплодородных субстратах. Высокая фосфат-солюбилизирующая способность ассоциированных с орхидеями ризобактерий отмечена и другими авторами: из 111 изолятов, выделенных из ризосферы разных видов орхидей Турции, 65 обладали способностью солюбилизировать фосфаты (Altinkaynak, Ozkoc, 2020).

Тем не менее к одновременному синтезу ИУК >1,0 мг/л и солюбилизации фосфатов (PO_4^{3-}) >50 мг/л оказались способны лишь 41 % изолятов ризобактерий на S-1 и 50 % – на S-2.

Устойчивость изолятов к ТМ оценивали по максимальной концентрации металла, при которой отмечался рост бактерий. Наиболее устойчивы бактерии оказались к цинку, он ингибировал рост выделенных бактерий с обоих участков лишь при концентрации 1000 мг/л, в то время как медь и никель подавляли рост при концентрациях 600 и 400 мг/л соответственно (рис. 2).

Концентрации никеля выше 300 мг/л выдерживало 31 % изолятов из естественного фитоценоза (S-1) и 35 % – из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале (S-2) (рис. 2а, б). К концентрациям меди более 400 мг/л были устойчивы 27 % бактерий, изолированных на S-1, и 39 % – на S-2 (рис. 2с, д). При концентрациях цинка выше 600 мг/л не прекращался рост у 25 % изолятов

из естественного фитоценоза и 43 % – с отвала (рис. 2е, ф).

На основании этого можно сделать заключение о том, что изоляты из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале, оказались более устойчивы к повышенным концентрациям ТМ, чем в естественном фитоценозе. Вероятно, это связано с хроническим «металлическим» стрессом и выживанием тех видов ризобактерий, которые способны переносить неблагоприятные условия среды.

Выборочные изоляты ризобактерий, которые проявляли наиболее высокую RGP-активность, были подвергнуты молекулярно-генетической идентификации. С использованием молекулярно-генетического анализа сиквенсов 16S рРНК, в 15 колониях, изолированных из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающем в естественном лесном фитоценозе (S-1), было выявлено 3 рода: *Buttiauxella*, *Pseudomonas* и *Bacillus*. Преобладающим родом среди изолированных колоний был *Buttiauxella*. Он был выявлен в 11 из 15 проанализированных образцов. Количество прочтений варьировало от 5214 до 401386, средняя точность выравнивания этих сиквенсов на референсный геном составила 91,5–94,0 %. В 3 колониях был идентифицирован род *Pseudomonas*. Минимальное количество прочтений составило 1591, максимальное – 4009. Идентичность с эталонным геномом варьировала от 93,6 до 93,9 %. Род *Bacillus* идентифицирован в одной изолированной колонии. Выявлено 2921 единичных прочтений со средним уровнем гомологии к референсному гену 94,1 %. Также была проведена молекулярно-генетическая идентификация 11 изолированных колоний, выделенных из ризосферы *E. atrorubens*, произрастающего на отвале вскрышных пород (S-2). Выявлено два рода: *Buttiauxella* и *Pseudomonas* (8 и 3 колонии соответствен-

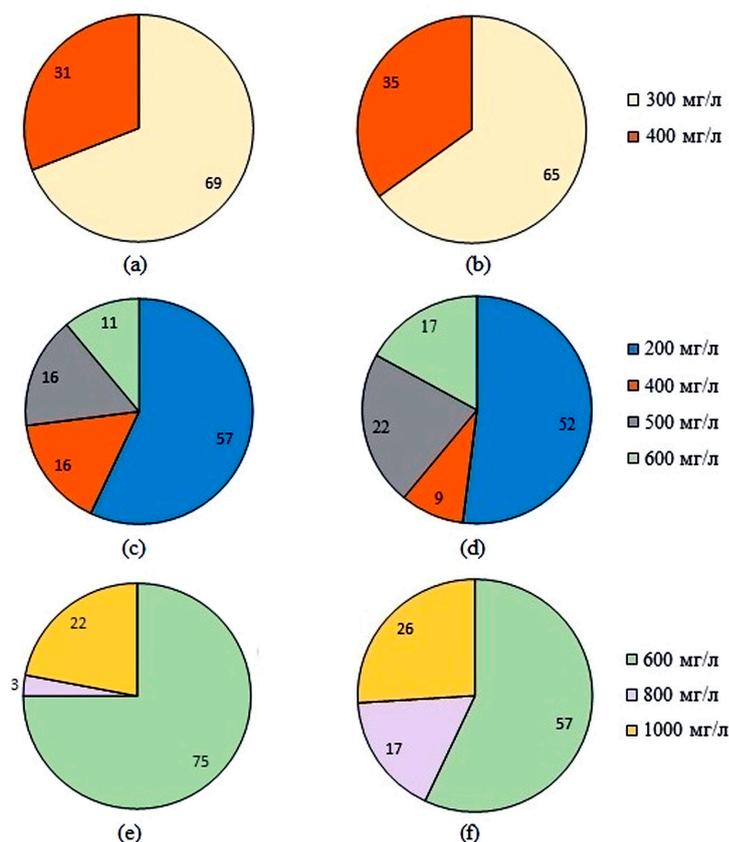


Рис. 2. Минимальная ингибирующая концентрация металлов для бактерий, выделенных из ризосферы *E. atrorubens* на участках S-1 (а, с, е) и S-2 (b, d, f). Данные представлены в процентах от общего числа изолятов тех колоний, которые прекращали свой рост при указанной концентрации металла: а, b – Ni; с, d – Cu; е, f – Zn

Fig. 2. Minimum inhibitory concentration of metals for bacteria isolated from the rhizosphere of *E. atrorubens* in S-1 (a, c, e) and S-2 (b, d, f) sites. Data are presented as a percentage of the total number of isolates of those colonies that did not grow at the indicated metal concentration: a, b – Ni; c, d – Cu; e, f – Zn

но). Общее количество прочтений варьировало от 16356 до 216996, уровень гомологии с референсными генами составил 91,6–91,7 %.

В целом можно отметить отсутствие существенных различий между изученными местообитаниями *E. atrorubens* по родовой принадлежности отобранных изолятов с наилучшей PGP-активностью. Особый интерес представляет сопоставление результатов молекулярно-генетического анализа с имеющимися в литературе данными. Присутствие в микробиоме разных видов орхидей

представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus* было отмечено многими авторами (Шеховцова и др., 2010; Коломейцева и др., 2013; Altinkaynak, Ozkoc, 2020; Jakubská-Busse et al., 2021; Herrera et al., 2022). Что касается рода *Buttiauxella*, сведения о нем ограничены. Ранее эндофитные бактерии *Buttiauxella agrestis* были обнаружены у близкородственного вида орхидеи *Epipactis helleborine* (Jakubská-Busse et al., 2021). Можно предположить, что широкое распространение штаммов этого рода в ризосфере *E. atrorubens* является особен-

ностью этой орхидеи. Исследования бактериальных сообществ близкородственных таксонов (*Epipactis albensis*, *E. helleborine*, *E. purpurata*), проведенные Jakubska-Busse et al. (2021), показали явные различия между видами. Причем некоторые из изученных видов орхидей произрастали в одних и тех же местообитаниях, однако их бактериальная микробиота отличалась друг от друга.

После проведения молекулярно-генетической идентификации у 26 изолятов были определены количественные показатели, отражающие способность к синтезу ИУК и солюбилизации фосфатов. Штамм ризобактерий, принадлежащий роду *Bacillus*, продемонстрировал наиболее низкую ростстимулирующую активность, поэтому в табл. 2 представлены данные только по изолятам, относящимся к двум родам (*Buttiauxella* и *Pseudomonas*).

По способности синтезировать ИУК у изученных изолятов наблюдалось варьирование в широких пределах (табл. 2): средний коэффициент вариации составлял 56 %. Достоверных различий как между представителями двух родов, так и между изученными местообитаниями (участки S-1 и S-2) не выявлено.

В целом количественные параметры, отражающие способность к синтезу ИУК, соответствуют данным других авторов (Tsavkelova et al., 2007; Шеховцова и др., 2012).

По фосфат-солюбилизирующей способности изоляты характеризовались меньшей вариабельностью: средний коэффициент вариации составлял 14 %. Бактерии рода *Pseudomonas* солюбилизировали фосфаты немного лучше, чем *Buttiauxella* (на 7 %). Между участками по фосфат-солюбилизирующей способности изолятов достоверных различий не выявлено. На основе количественной оценки способности изолятов к синтезу ИУК и солюбилизации фосфатов было отобрано 4 штамма бактерий, обладающих наиболее высокими показателями PGP-активности, включая 2 штамма, относящихся к роду *Buttiauxella*, и 2 – к роду *Pseudomonas*. Эти штаммы были протестированы на семенах циннии для оценки их влияния на прорастание семян и длину проростков (рис. 3).

Тестирование изолятов на циннии не выявило достоверных различий от контроля по всхожести семян (рис. 3а). Инокуляция семян циннии изолятами *Buttiauxella* sp. увеличивала длину проростков в сравнении с кон-

Таблица 2. Содержание ИУК и растворимых фосфатов в культуральной жидкости отобранных изолятов ризобактерий *E. atrorubens*

Table 2. The content of IAA and soluble phosphates in the culture liquid of selected isolates of *E. atrorubens* rhizobacteria

Участок	Бактерии	ИУК, мг/л		Фосфаты (PO ₄ ³⁻), мг/л	
		Среднее ± SE	Lim (min–max)	Среднее ± SE	Lim (min–max)
S-1	<i>Buttiauxella</i> sp.	15,1 ± 1,5	7,5–21,5	104,7 ± 2,5	88,9–113,4
S-2	<i>Buttiauxella</i> sp.	11,1 ± 1,7	7,4–21,3	99,0 ± 4,8	67,3–112,9
S-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	7,7 ± 3,7	1,1–16,4	105,6 ± 0,8	104,6–107,1
S-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	12,6 ± 2,1	8,4–17,1	105,2 ± 6,0	95,2–116,0

Примечание: представлены средние арифметические значения ± стандартные ошибки (SE) и диапазон (Lim) минимальных (min) и максимальных (max) значений. Различия между исследуемыми участками не достоверны при $p < 0,05$ ($n = 3–11$).

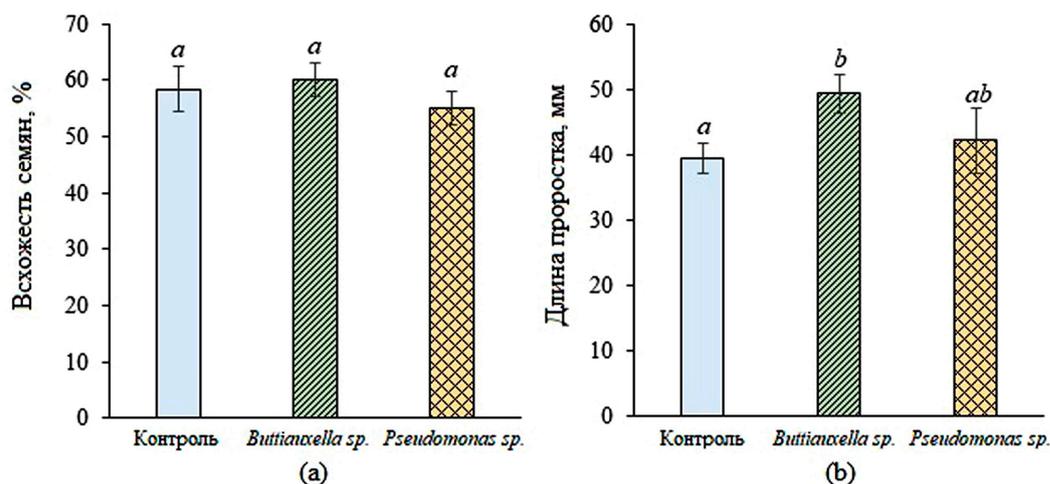


Рис. 3. Результаты оценки влияния выделенных штаммов *Buttiauxella sp.* и *Pseudomonas sp.* на всхожесть семян (а) и длину проростков (б) циннии. Данные представлены как средние арифметические значения \pm стандартные ошибки (SE); разными буквами отмечены достоверные различия между исследуемыми участками при $p < 0,05$ ($n = 60$ при оценке всхожести; $n = 15$ при измерении длины проростков)

Fig. 3. The results of assessing the impact of the isolated strains of *Buttiauxella sp.* and *Pseudomonas sp.* on seed germination (a) and seedling length (b) of zinnia. Data are presented as mean values \pm standard errors; different letters indicate significant differences between the study sites at $p < 0.05$ ($n = 60$ for seed germination; $n = 15$ for seedling length)

тролем (в среднем на 25 %), в то время как достоверного влияния изолятов *Pseudomonas sp.* на длину проростков не выявлено (рис. 3б).

Исследования, направленные на оценку способности бактерий, ассоциированных с разными видами орхидей, благоприятствовать прорастанию семян и развитию растений, проводили и другие авторы (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2007; Galdiano et al., 2011; Рассохина и др., 2020; Сидоров и др., 2020). В целом результаты этих исследований свидетельствуют о положительном влиянии изолятов на всхожесть и ростовые параметры проростков некоторых видов орхидей (Wilkinson et al., 1994; Tsavkelova et al., 2007; Galdiano et al., 2011) и ряда культурных растений (Рассохина и др., 2020; Сидоров и др., 2020). Вместе с тем отмечено, что не все штаммы бактерий, активные в производстве ИУК, способствовали прорастанию семян. Так, при тестировании изолятов *Rhizobium sp.* на тропической орхи-

дее *Dendrobium moschatum* прорастания семян не наблюдалось, поскольку эти бактерии образовывали обильную внеклеточную слизь, которая покрывала семена толстым (до 3 мм) слоем (Tsavkelova et al., 2007). В исследованиях Wilkinson et al. (1994) на семенах орхидеи *Pterostylis vitata* было протестировано семь штаммов, принадлежащих четырем родам. Оказалось, что большая часть изолятов способствовала симбиотическому прорастанию семян, в то время как некоторые штаммы ингибировали этот процесс. Разные наблюдаемые эффекты, возможно, объясняются отсутствием унифицированного подхода к инокуляции тестируемых семян и сложностью взаимоотношений между растениями и ассоциативными микроорганизмами.

Заключение

Изучение культивируемых бактериальных изолятов из ризосферы орхидеи *Epipactis*

atrorubens, произрастающей на серпентинитовых субстратах Среднего Урала, показало, что по способности ризобактерий к синтезу ИУК и солюбилизации фосфатов существенных различий между изученными местообитаниями не выявлено. По способности к азотфиксации выделялись изоляты ризобактерий орхидеи из трансформированной экосистемы. Более того, они оказались более устойчивы к повышенным концентрациям тяжелых металлов (Ni, Cu, Zn) по сравнению с ризобактериями из естественного фитоценоза.

Молекулярно-генетическая идентификация изолятов с наилучшей PGP-активностью показала их сходный таксономический состав. Большинство выделенных штаммов были представлены одиночными грамотрицательными палочками и принадлежали к родам *Buttiauxella* и *Pseudomonas*.

Инокуляция семян циннии выборочными штаммами *Pseudomonas* sp. и *Buttiauxella* sp. не оказывала достоверно значимого влияния на их всхожесть. При этом *Buttiauxella* sp. способствовала увеличению длины проростков в сравнении с контролем (в среднем на 25 %).

Полученные результаты позволяют сделать предположение о том, что выделенные изоляты ризобактерий *E. atrorubens*, благодаря ростстимулирующей активности и металлоторолерантности, могут способствовать адаптации орхидеи к техногенному субстрату. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение таксономического состава бактериальных сообществ с помощью метагеномного анализа и более детальное изучение их характеристик, способствующих росту и жизнедеятельности орхидей в неблагоприятных условиях среды обитания.

Список литературы / References

- Белимов А. А. (2012) *Взаимодействия ассоциативных бактерий с растениями: роль биотических и абиотических факторов*. Saarbrucken, Palmarium Academic Publishing, 225 с. [Belimov A. A. (2012) *Interaction of associative bacteria with plants: the role of biotic and abiotic factors*. Saarbrucken, Palmarium Academic Publishing, 225 p. (in Russian)]
- Боронин А. М. (1998) Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений. *Соросовский образовательный журнал*, 10: 25–31 [Boronin A. M. (1998) Plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas*. *Soros Educational Journal* [Sorosovskii obrazovatel'nyi zhurnal], 10: 25–31 (in Russian)]
- Вадюнина А. Ф., Корчагина З. А. (1986) *Методы исследования физических свойств почв*. Москва, Агропромиздат, 416 с. [Vadyunina A. F., Korchagina Z. A. (1986) *Methods for studying the physical properties of soils*. Moscow, Agropromizdat, 416 p. (in Russian)]
- Коломейцева Г. Л., Цавкелова Е. А., Колобов Е. С. (2013) Динамические сообщества оранжевых биоценозов в экспозициях тропических и субтропических растений. *Научный журнал КубГАУ*, 87: 43–54 [Kolomeitseva G. L., Tsavkelova E. A., Kolobov Y. S. (2013) Dynamic communities of greenhouse biocenoses in expositions of tropical and subtropical plants. *Scientific Journal of Kuban State Agrarian University* [Nauchnyi zhurnal KubGAU], 87: 43–54 (in Russian)]
- Красная книга Свердловской области: животные, растения, грибы* (2018) Коротин Н. С. (отв. ред.) Екатеринбург, ООО «Мир», 450 с. [Red Book of the Sverdlovsk region: animals, plants, mushrooms (2018) N. S. Korytin (ed.) Ekaterinburg, Mir LLC, 450 p. (in Russian)]
- Мамаев С. А., Князев М. С., Куликов П. В., Филиппов Е. Г. (2004) *Орхидные Урала: систематика, биология, охрана*. Екатеринбург, УрО РАН, 124 с. [Mamaev S. A., Knyazev M. S.,

Kulikov P. V., Filippov E. G. (2004) *Orchids of the Urals: systematics, biology, protection*. Ekaterinburg, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 124 p. (in Russian)]

Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М., Колотилова Н. Н. (2005) *Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений*. Нетрусов А. И. (ред.) Москва, Издательский центр «Академия», 608 с. [Netrusov A. I., Egorova M. A., Zakharchuk L. M., Kolotilova N. N. (2005) *Workshop on Microbiology: Textbook for students of higher educational institutions*. Netrusov A. I. (ed.) Moscow, Publishing Center “Academy”, 608 p. (in Russian)]

Перебора Е. А. (2011) *Экология орхидных Северо-Западного Кавказа*. Краснодар, КубГАУ, 441 с. [Perebora E. A. (2011) *Ecology of orchids in the Northwestern Caucasus*. Krasnodar, Kuban State Agrarian University, 441 p. (in Russian)]

Рассохина И. И., Платонов А. В., Маракаев О. А. (2020) Влияние штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18, изолированного из подземных органов *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae Juss.), на ростовые процессы культурных растений. *Международный научно-исследовательский журнал*, 6–2: 20–24 [Rassokhina I. I., Platonov A. V., Marakaev O. A. (2020) Influence of *Pseudomonas* sp. GEOT188 strain, isolated from underground bodies of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae Juss.) on growth processes of cultural plants. *International Research Journal* [Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal], 6–2: 20–24 (in Russian)]

Сидоров А. В., Зайцева Ю. В., Маракаев О. А. (2020) Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro*. *Вестник Томского государственного университета. Биология*, 51: 6–24 [Sidorov A. V., Zaytseva Y. V., Marakaev O. A. (2020) Effect of supernatant of associative bacteria of the genus *Pseudomonas* on germination, morphogenesis and growth of *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) *in vitro*. *Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta, Biologiya*, 51: 6–24 (in Russian)]

Филимонова Е. И., Лукина Н. В., Глазырина М. А. (2014) Орхидные в техногенных экосистемах Урала. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 11: 68–75 [Filimonova E. I., Lukina N. V., Glazyrina M. A. (2014) Orchids in technogenic ecosystems of Ural. *Optimization and Protection of Ecosystems* [Ekosistemy, ih optimizatsiya i ohrana], 11: 68–75 (in Russian)]

Шеховцова Н. В., Первушина К. А., Маракаев О. А., Холмогоров С. В., Осипов Г. А. (2010) Микроорганизмы, ассоциированные с подземными органами растений семейства Orchidaceae средней полосы России. *Проблемы агрохимии и экологии*, 4: 30–36 [Shekhovtsova N. V., Pervushina K. A., Marakaev O. A., Kholmogorov S. V., Osipov G. A. (2010) Microorganisms associated with underground organs of central Russia Orchidaceae. *Problems of Agrochemistry and Ecology* [Problemy agrokhimii i ekologii], 4: 30–36 (in Russian)]

Шеховцова Н. В., Первушина К. А., Маракаев О. А., Охупкина В. А. (2012) Кинетические параметры роста бактерий, ассоциированных с подземными органами *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Фундаментальные исследования*, 3–3: 542–544 [Shekhovtsova N. V., Pervushina K. A., Marakaev O. A., Okhapkina V. A. (2012) The growth kinetic parameters of the bacteria, associated with underground organs of the *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó (Orchidaceae). *Fundamental Research* [Fundamental'nye issledovaniya], 3–3: 542–544 (in Russian)]

Adamowski W. (2006) Expansion of native orchids in anthropogenous habitats. *Polish Botanical Studies*, 22: 35–44

Altinkaynak H., Ozkoc I. (2020) Isolation and molecular characterization of plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of orchids in Turkey. *Rhizosphere*, 16: 100280

Bayman P., Otero J.T. (2006) Microbial endophytes of orchid roots. *Microbial root endophytes. Soil Biology, Volume 9*. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds.) Springer, Berlin, Heidelberg, p. 153–177

Bric J.M., Bostock R.M., Silverstone S.E. (1991) Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 535–538

Chibrik T.S., Lukina N.V., Filimonova E.I., Glazyrina M.A., Rakov E.A., Maleva M.G., Prasad M.N.V. (2016) Biological recultivation of mine industry deserts: facilitating the formation of phytocoenosis in the Middle Ural region, Russia. *Bioremediation and Bioeconomy*. Prasad M.N.V. (ed.) Amsterdam, Elsevier, p. 389–418

Djordjević V., Tsiftsis S., Lakušić D., Stevanović V. (2016) Niche analysis of orchids of serpentine and non-serpentine areas: Implications for conservation. *Plant Biosystems*, 150(4): 710–719

Faria D.C., Dias A.C.F., Melo I.S., de Carvalho Costa F.E. (2013) Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2): 217–221

Filimonova E.I., Lukina N.V., Glazyrina M.A., Borisova G.G., Maleva M.G., Chukina N.V. (2019) Endangered orchid plant *Epipactis atrorubens* on serpentine and granite outcrops of Middle Urals, Russia: a comparative morphophysiological study. *AIP Conference Proceedings*, 2063: 040016

Filimonova E., Lukina N., Glazyrina M., Borisova G., Tripti, Kumar A., Maleva M. (2020) A comparative study of *Epipactis atrorubens* in two different forest communities of the Middle Urals, Russia. *Journal of Forestry Research*, 31(6): 2111–2120

Galdiano R.F. Jr., Pedrinho E.A.N., Castellane T.C.L., Lemos E.G.M. (2011) Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 35(3): 729–737

Herrera H., Fuentes A., Soto J., Valadares R., Arriagada C. (2022) Orchid-associated bacteria and their plant growth promotion capabilities. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture. Reference Series in Phytochemistry*. Merillon J.-M., Kodja H. (eds.) Springer, Cham, p. 175–200

Jakubaska-Busse A., Kedziora A., Cieniuch G., Korzeniowska-Kowal A., Bugla-Płoskonska G. (2021) Proteomics-based identification of orchid-associated bacteria colonizing the *Epipactis albensis*, *E. helleborine* and *E. purpurata* (Orchidaceae, Neottieae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7): 4029–4038

Jurkiewicz A., Turnau K., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W., Godzik B. (2001) Heavy metal localisation in mycorrhizas of *Epipactis atrorubens* (Hoffm.) Besser (Orchidaceae) from zinc mine tailings. *Protoplasma*, 218(3–4): 117–124

Kulikov P.V., Filippov E.G. (2001) Specific features of mycorrhizal symbiosis formation in the ontogeny of orchids of the temperate zone. *Russian Journal of Ecology*, 32(6): 408–412

Kumar A., Tripti, Voropaeva O., Maleva M., Panikovskaya K., Borisova G., Rajkumar M., Bruno L.B. (2021a) Bioaugmentation with copper tolerant endophyte *Pseudomonas lurida* strain EOO26 for improved plant growth and copper phytoremediation by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 266: 128983

- Kumar A., Tripti, Maleva M., Bruno L.B., Rajkumar M. (2021b) Synergistic effect of ACC deaminase producing *Pseudomonas* sp. TR 15a and siderophore producing *Bacillus aerophilus* TR 15c for enhanced growth and copper accumulation in *Helianthus annuus* L. *Chemosphere*, 276: 130038
- Kumar S., Chaudhuri S., Maiti S.K. (2013) Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil – a review. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13(7): 898–906
- Lugtenberg B., Kamilova F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541–556
- Rajakaruna N., Boyd R. S. (2014) *Serpentine soils. Oxford bibliographies in ecology*. Gibson D. (ed.) Oxford University Press, New York
- Rajkumar M., Ma Y., Freitas H. (2013) Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR 28C. *Journal of Environmental Management*, 128: 973–980
- Rajkumar M., Bruno L. B., Banu J.R. (2017) Alleviation of environmental stress in plants: the role of beneficial *Pseudomonas* spp. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(6): 372–407
- Rana A., Saharan B., Joshi M., Prasanna R., Kumar K., Nain L. (2011) Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology*, 61(4): 893–900
- Rasmussen H.N. (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244(1–2): 149–163
- Rewiz A., Bomanowska A., Shevera M., Kurowski J., Krason K., Zielinska K. (2017) Cities and disturbed areas as man-made shelters for orchid communities. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(1): 126–139
- Ribeiro C. M., Cardoso E. J.B.N. (2012) Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167(2): 69–78
- Smith S.E., Read D.J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis* (Third Edition). N.Y., Academic Press, 787 p.
- Sokolova M.G., Akimova G.P., Vaishlya O.B. (2011) Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3): 274–278
- Swarts N.D., Dixon K. W. (2009) Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3): 543–556
- Tsavkelova E. A., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. (2005) Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74(1): 46–53
- Tsavkelova E. A., Cherdyntseva T.A., Klimova S. Y., Shestakov A.I., Botina S. G., Netrusov A.I. (2007) Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology*, 188(6): 655–664
- Vakhrameeva M.G., Tatarenko I.V., Varlygina T.I., Torosyan G.K., Zagulskii M.N. (2008) *Orchids of Russia and adjacent countries (within the borders of the former USSR)*. Koenigstein, Germany, Koeltz Scientific Books, 690 p.
- Vessey J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2): 571–586
- Wilkinson K. G., Dixon K. W., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L. (1994) Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and Soil*, 159(2): 291–295

DOI 10.17516/1997-1389-0390

EDN: BMIDID

УДК 579

The Influence of Hydrocarbon-Oxidizing Auxin-Producing Bacteria on the Growth, Biochemical Parameters, and Hormonal Status of Barley Plants in the Process of Bioremediation of Oil-Contaminated Soil

**Gulnaz F. Rafikova,
Elena V. Kuzina, Lidia B. Vysotskaya,
Tatiana N. Arkhipova, Tatiana Yu. Korshunova*,
Darya V. Chetverikova, Margarita D. Bakaeva,
Guzel R. Kudoyarova and Sergey P. Chetverikov**
*Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of RAS
Ufa, Russian Federation*

Received 07.06.2021, received in revised form 29.12.2021, accepted 08.02.2022

Abstract. Extensive research has been done to investigate the relationship between bacteria and plants in the process of bioremediation of soils contaminated with oil, but the effect of oil-degrading bacteria that synthesize phytohormones on the content and distribution of these compounds in plants has been poorly studied. The aim of the field experiment was to study the effect of hydrocarbon-oxidizing bacteria producing auxins on the growth, biochemical parameters, and hormonal status of barley plants in the presence of oil and the prospects for using bacterial-plant associations for treating soil that contains oil (2.7 %, on average). Treatment of plants with cultures of *Enterobacter* sp. UOM 3 and *Pseudomonas humanensis* IB C7 led to an increase in the length and mass of roots and shoots and the leaf surface index and an improvement in the parameters of the components of the crop structure that were suppressed by the pollutant. As a result of bacterization, the contents of chlorophyll and flavonoids increased, and the amount of proline decreased. The most noticeable effect of bacteria on the hormonal system of plants was a decrease in the accumulation of abscisic acid. The data obtained indicate that the treatment of plants with bacterial cultures alleviated the negative consequences of

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: korshunovaty@mail.ru

ORCID: 0000-0001-7655-5588 (Rafikova G.); 0000-0002-6905-0108 (Kuzina E.); 0000-0001-9348-9316 (Vysotskaya L.); 0000-0002-6971-1084 (Arkhipova T.); 0000-0002-6186-0827 (Korshunova T.); 0000-0002-4917-0831 (Chetverikova D.); 0000-0001-8738-4534 (Bakaeva M.); 0000-0001-6409-9976 (Kudoyarova G.); 0000-0002-7961-1503 (Chetverikov S.)

abiotic stress caused by the presence of oil for plants. The use of oil-degrading bacteria and plants in combination rather than separately more effectively reduced the content of hydrocarbons in the soil and increased its microbiological activity. The microbial-plant combinations studied in this work are regarded as promising for the bioremediation of oil-contaminated soils.

Keywords: oil pollution, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Hordeum vulgare* L., phytohormones, chlorophyll, flavonoids, nitrogen balance index, proline.

Acknowledgments. This work was supported by the state budget (No. AAAA-A18-118022190100-9) and the grant of the Russian Foundation for Basic Research No. 18–29–05025.

Citation: Rafikova G.F., Kuzina E.V., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Korshunova T. Yu., Chetverikova D.V., Bakaeva M.D., Kudoyarova G.R., Chetverikov S.P. The influence of hydrocarbon-oxidizing auxin-producing bacteria on the growth, biochemical parameters, and hormonal status of barley plants in the process of bioremediation of oil-contaminated soil. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2022, 15(3), 314–332. DOI: 10.17516/1997-1389-0390



Влияние углеводородокисляющих бактерий, продуцирующих ауксины, на рост, биохимические показатели и гормональный статус растений ячменя в процессе биоремедиации нефтезагрязненной почвы

**Г. Ф. Рафикова, Е. В. Кузина, Л. Б. Высоцкая,
Т. Н. Архипова, Т. Ю. Коршунова, Д. В. Четверикова,
М. Д. Бакаева, Г. Р. Кудоярова, С. П. Четвериков**
*Уфимский институт биологии
Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Российская Федерация, Уфа*

Аннотация. Взаимосвязи бактерий и растений в процессе биоремедиации почв, загрязненных нефтью, уделяется много внимания, однако воздействие бактерий-деструкторов нефти, синтезирующих фитогормоны, на содержание и распределение этих соединений в самих растениях, исследовано слабо. Целью полевого опыта было изучение влияния углеводородокисляющих бактерий, продуцирующих ауксины, на ростовые, биохимические показатели и гормональный статус растений ячменя в присутствии нефти и перспективы применения их ассоциаций для очистки почвы, содержащей нефть (в среднем 2,7 %). Обработка растений штаммами *Enterobacter* sp. UOM 3 и *Pseudomonas hunanensis* IB C7 приводила к увеличению длины и массы корней и побегов, индекса листовой поверхности и улучшению показателей элементов структуры урожая, которые были угнетены под воздействием

поллютанта. В результате бактеризации повышалось содержание хлорофилла, флавоноидов и снижалось количество пролина. Наиболее заметным проявлением влияния бактерий на гормональную систему растений было уменьшение накопления абсциссовой кислоты. Полученные данные свидетельствуют о том, что интродукция микроорганизмов ослабляла для растений негативные последствия абиотического стресса, вызванного присутствием нефти. Совместное применение бактерий-нефтедеструкторов и растений эффективнее снижало содержание углеводов в почве и увеличивало ее микробиологическую активность по сравнению с использованием их по отдельности. Изученные микробно-растительные комплексы признаны перспективными для биоремедиации нефтезагрязненных почв.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Hordeum vulgare* L., фитогормоны, хлорофилл, флавоноиды, индекс азотного баланса, пролин.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке средств государственного бюджета (№ АААА-А18-118022190100-9) и гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-05025.

Цитирование: Рафикова, Г.Ф. Влияние углеводородокисляющих бактерий, продуцирующих ауксины, на рост, биохимические показатели и гормональный статус растений ячменя в процессе биоремедиации нефтезагрязненной почвы / Г.Ф. Рафикова, Е.В. Кузина, Л.Б. Высоцкая, Т.Н. Архипова, Т.Ю. Коршунова, Д.В. Четверикова, М.Д. Бакаева, Г.Р. Кудоярова, С.П. Четвериков // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 314–332. DOI: 10.17516/1997-1389-0390

Введение

Функционирование нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности приводит к глобальному загрязнению окружающей среды углеводородами, токсичными для растений, животных и человека. Наиболее экологически чистым и экономически целесообразным решением данной проблемы является применение биологических технологий и, в частности, микробно-растительных комплексов. Они состоят из микроорганизмов, разрушающих органические загрязнители или трансформирующих их в менее токсичные соединения, и растений, создающих оптимальные условия существования и размножения бактерий (Koshlaf, Ball, 2017). Корни обеспечивают поверхности для прикрепления микроорганизмов и выделяют экссудаты, которые способствуют возрастанию их численности в ризосфере (Rohrbacher, St-

Arnaud, 2016; Chetverikov et al., 2021), а также синтезируют ферменты, осуществляющие деградацию органических субстратов, находящихся в почве (Muratova et al., 2015). В целом развитие корневой системы увеличивает пористость почвы, что усиливает массовый перенос субстрата и акцепторов электронов в процессе окисления компонентов нефти (Gkorezis et al., 2016). Ризосферные микроорганизмы, в свою очередь, активируют антиоксидантную систему растений (Kim et al., 2013), которая помогает им справляться с неблагоприятными условиями при нефтяном загрязнении, и могут интенсифицировать рост растений путем выделения различных биологически активных веществ, улучшения фосфорного, азотного питания и повышения стрессоустойчивости, а также опосредованной стимуляции за счет антагонизма в отношении фитопатогенных агентов (Korshunova

et al., 2019; Viesser et al., 2020). Таким образом, взаимодействие растений и микроорганизмов в загрязненной нефтью почве представляется идеальным примером взаимовыгодного партнерства, что может использоваться в процессах очистки и восстановления антропогенно нарушенных территорий. Однако несмотря на то, что влияние бактерий на растения в процессе биоремедиации почв, контаминированных углеводородами, активно изучается, некоторые его аспекты, например, воздействие бактерий-деструкторов нефти, синтезирующих гормоны, на содержание и распределение гормонов в самих растениях, практически не исследованы, хотя в случае некоторых других стрессовых факторов (засуха, засоление) такие эксперименты были проведены (Habib et al., 2016; Arkhipova et al., 2020). Чтобы восполнить этот пробел, нами был проведен ряд лабораторных опытов (Bakaeva et al., 2020; Vysotskaya et al., 2021). Полученные в них результаты были использованы при подготовке полевого эксперимента, целью которого было оценить влияние углеводородоксилирующих ауксинпродуцирующих бактерий на ростовые, биохимические показатели и гормональный статус растений ячменя в присутствии нефти и эффективность применения данных микробно-растительных комплексов для биоремедиации нефтезагрязненной почвы.

Материалы и методы

Исследование проводили на территории Уфимского района Республики Башкортостан со 2 июня по 8 сентября 2020 г. (98 суток). Погодные показатели в этот период находились в пределах среднестатистических параметров за последние 5 лет.

В работе использовали растения ячменя (*Hordeum vulgare* L., районированный сорт Челябинский 99) как нефтеустойчивые и высококочувствительные к инокуляции углево-

дородоксилирующими бактериями (Высоцкая и др., 2019; Bakaeva et al., 2020) и штаммы-нефтедеструкторы из коллекции Уфимского института биологии УФИЦ РАН *Enterobacter* sp. UOM 3 и *Pseudomonas hunanensis* IB C7, синтезирующие индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) (Четвериков и др., 2019; Bakaeva et al., 2020).

Экспериментальную площадку, почва которой (чернозем глинисто-иллювиальный, 3,7 % C_{орг}, 6,6 % гумуса, pH водной вытяжки 5,7) была загрязнена товарной нефтью марки Urals, разбили на участки по 1,5 м². Среднее содержание нефти составило 2,7 %. Опыт закладывали в 7 вариантах в трех повторностях каждый:

1. Чистая почва + растения ячменя без бактериальной обработки (контроль)
2. Нефтезагрязненная почва
3. Нефтезагрязненная почва + растения ячменя без бактериальной обработки
4. Нефтезагрязненная почва + *Enterobacter* sp. UOM 3
5. Нефтезагрязненная почва + *Enterobacter* sp. UOM 3 + растения ячменя
6. Нефтезагрязненная почва + *Pseudomonas hunanensis* IB C7
7. Нефтезагрязненная почва + *P. hunanensis* IB C7 + растения ячменя

Инокуляция семян жидкой культурой бактерий в количестве 10⁶ КОЕ/семя (КОЕ – колониеобразующие единицы) проходила непосредственно перед посевом. Небактеризованные семена смачивали водой. После обработки семена высаживали либо в чистую, либо в загрязненную почву (600 шт./м²) на глубину 4–5 см. После чего участки вариантов с 4 по 7 сразу поливали 5 л жидкой культуры бактерий (титр 1·10⁸ КОЕ/мл). Лабораторная всхожесть семян составляла 92 %.

Через 10 и 34 дня после появления всходов измеряли ростовые характеристики и не-

которые биохимические показатели растений. Выбор указанных сроков связан с тем, что в настоящем эксперименте на 10-е сутки растения ячменя находились в процессе активного роста, и их биомасса была уже достаточной для оценки биохимических характеристик. На 34-е сутки приходилась фаза цветения растений, и различия между ними на контрольных и опытных участках были очень заметны, поэтому в эти сроки анализировали их биохимические показатели. В указанный период ростовые показатели корней не измеряли, т.к. мочковатая корневая система злаковых растений достаточно разрослась, и извлечь растение из почвы, не повредив при этом корни, не представлялось возможным. Содержание в листьях хлорофилла ($a+b$), флавоноидов и индекс азотного баланса (NBI) измеряли с помощью прибора DUALEX SCIENTIFIC+ (FORCE-A, France) согласно рекомендациям производителя, а свободного пролина – по методу Бейтса (Bates et al., 1973), используя толуол в качестве экстрагента. Индекс листовой поверхности, представляющий собой относительную величину, показывающую уровень покрытия листьями поверхности почвы, оценивали, анализируя фотографии с помощью программы ImageJ (v. 1.48, National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

В конце эксперимента был проведен анализ отдельных элементов структуры урожая. Так как растения рассматривались только как агенты биорекультивации, использование растительной продукции в качестве пищи для человека и животных не предусматривалось. В связи с этим качественные и количественные показатели зерна не измерялись.

На 34-е и 94-е сутки после появления всходов были отобраны образцы почвы на микробиологические исследования и содержание углеводов. Численность ге-

теротрофных микроорганизмов определяли посевом почвенной суспензии на мясопептонный агар, олигонитрофильных – на среду Эшби, углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) – на среду Раймонда с добавлением дизельного топлива (Raymond, 1961; Дзержинская, 2008). Содержание нефтепродуктов в почве измеряли гравиметрическим методом (ПНД Ф 16.1.41–04).

Через 10 суток после появления всходов оценивали концентрацию гормонов в побегах и корнях. Экстракцию ИУК и абсцизовой кислоты (АБК) осуществляли согласно (Veselov et al., 1992; Kudoyarova et al., 2017). Очистку и анализ цитокининов (зеатин, его рибозид и нуклеотид) проводили согласно (Kudoyarova et al., 2014). Содержание гормонов определяли методом ИФА с использованием соответствующих антител (Веселов, 1998).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных программ MS Excel. На рисунках и в таблицах данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Присутствие нефти ингибировало рост корней и побегов на начальной стадии развития растений. Длина этих органов была меньше контрольных значений в 1,6 и 2,6 раза соответственно (рис. 1). При обработке штаммом *P. humanensis* IB C7 длина корней увеличивалась по сравнению с необработанным нефтезагрязненным вариантом. Инокуляция бактериями *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. humanensis* IB C7 вызывала удлинение побегов на 12–13 %. Аналогичная тенденция была отмечена при анализе сырой массы корней и побегов (табл. 1). Под влиянием нефти она снизилась на 27 и 80 % соответственно, при этом соот-

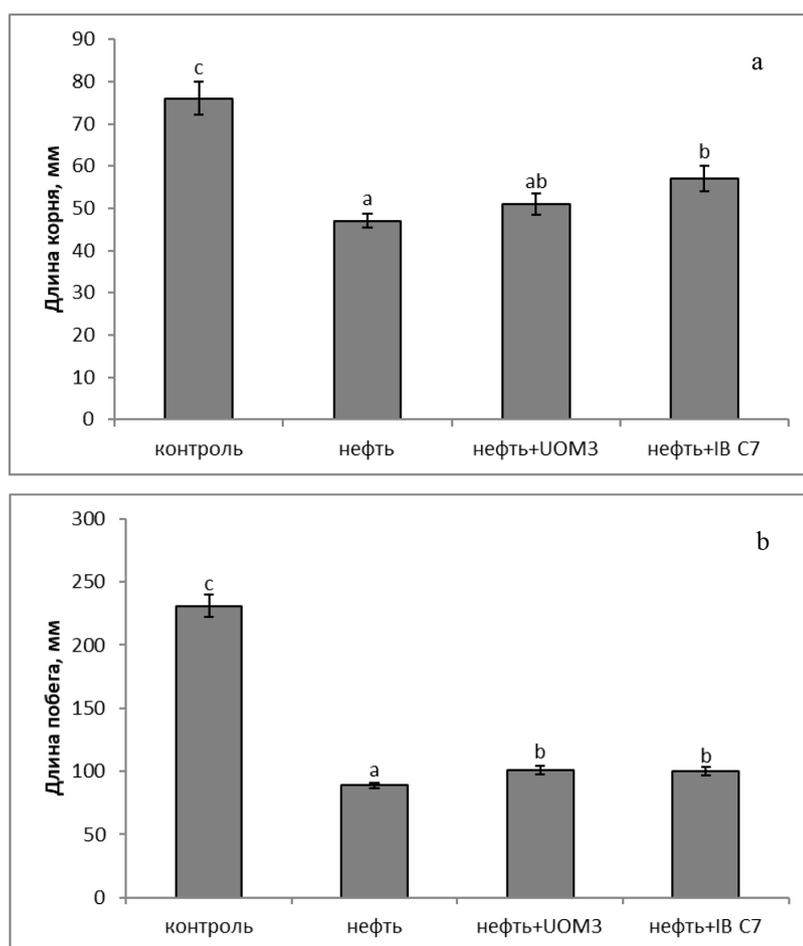


Рис. 1. Длина корней (а) и побегов (б) растений ячменя через 10 суток после появления всходов. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами (n=15, p<0,05). UOM 3 и IB C7 – варианты экспериментов с внесением *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. hunanensis* IB C7 соответственно.

Fig. 1. Root (a) and shoot (b) length of barley plants 10 days after germination. Statistically different means for each indicator are marked with different letters (n=15, p<0.05). UOM 3 and IB C7 – treatments with *Enterobacter* sp. UOM 3 and *P. hunanensis* IB C7, respectively

Таблица 1. Масса побегов и корней растений ячменя через 10 суток после появления всходов

Table 1. The mass of shoots and roots of barley plants 10 days after germination

Вариант опыта	Сырая масса, мг		Масса корня/ масса побега
	корня	побега	
Контроль	34,4±2,0 ^b	318,4±7,5 ^c	0,11±0,012 ^a
Нефть	25,1±1,1 ^a	64,9±1,0 ^a	0,39±0,080 ^b
Нефть + UOM 3	30,1±2,1 ^{ab}	80,3±4,3 ^{ab}	0,37±0,058 ^b
Нефть + IB C7	41,9±0,8 ^c	85,9±2,8 ^b	0,49±0,043 ^b

Примечание. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами, n=15 (p<0,05). UOM 3 и IB C7 – варианты экспериментов с внесением *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. hunanensis* IB C7 соответственно

ношение масс корня и побега повышалось с 0,11 в контроле до 0,37–0,49 в загрязненной почве. При использовании штамма бактерий *P. huanensis* IB C7 наблюдалась достоверная прибавка массы корней и побегов по сравнению с данными показателями в нефтезагрязненной почве без обработки.

Определение длины надземной части растений через 34 дня после появления всходов показало, что в целом закономерности в изменении показателей роста побегов сохранились (рис. 2). Ингибирующий эффект нефти на рост растений ячменя со временем не снижался: длина растений, выращенных в контаминированной почве, была в 3 раза ниже, чем в чистой. Бактеризация благоприятно воздействовала на растения: при обработке штаммами *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. huanensis* IB C7 их длина была больше

на 31 и 43 % соответственно, чем в нефтезагрязненной почве.

Индекс листовой поверхности растений, подвергшихся воздействию нефти, был в 2,4 раза ниже, чем в контроле (рис. 2). При внесении штаммов *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. huanensis* IB C7 он увеличивался на 45 и 50 % соответственно.

Оценка влияния нефти и бактеризации на некоторые показатели роста и развития растений ячменя в конце опыта представлена в табл. 2. Загрязнение почвы снижало массу побегов в 2,6 раза, кустиность – в 2,8 раза, длину побегов – в 1,9 раза. Обработка растений штаммами бактерий оказывала стимулирующий эффект, который выражался в увеличении этих показателей на 3–15 %.

Количество колосьев, которые образовались у растений, выращенных в контамини-

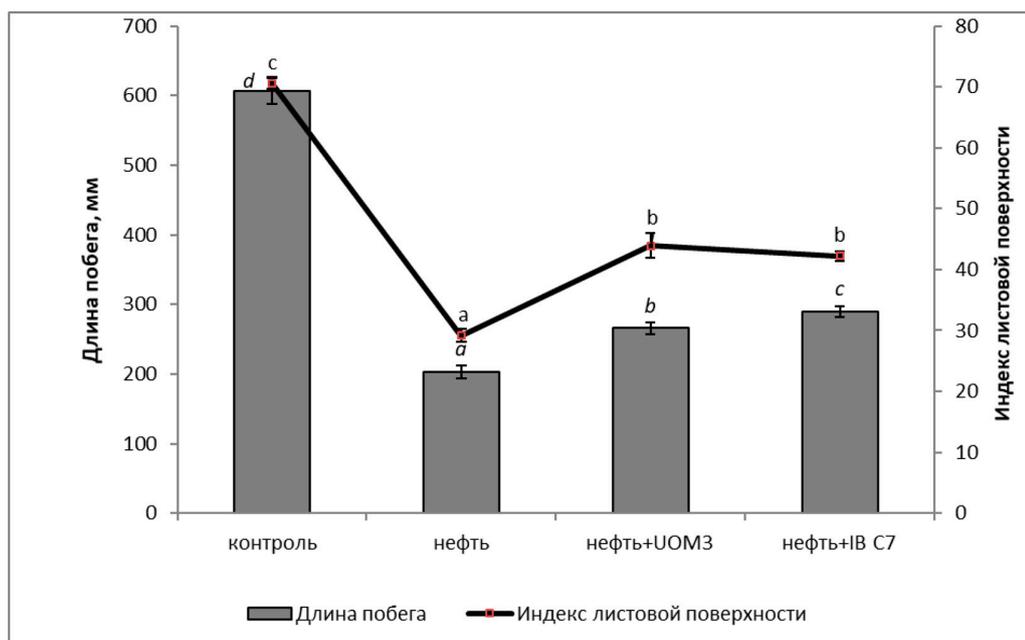


Рис. 2. Длина побегов и индекс листовой поверхности растений ячменя через 34 дня после появления всходов. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($n=50$, $p \leq 0,05$). Обозначения вариантов как на рис. 1.

Fig. 2. Shoot length and leaf area index of barley plants 34 days after germination. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ($n=50$, $p \leq 0,05$). Notations of treatments are the same as in Fig. 1.

Таблица 2. Влияние загрязнения нефтью и обработки бактериями на некоторые показатели роста и развития растений ячменя (через 94 дня после появления всходов)

Table 2. The influence of oil pollution and treatment with bacteria on some indicators of growth and development of barley plants 94 days after germination

Вариант опыта	Количество побегов кущения, шт.	Длина побега, см	Количество колосьев на одно растение, шт.	Длина главного колоса, см	Число колосков в главном колосе, шт.	Сухая масса побега, г
Контроль	4,96±0,28 ^c	52,24±1,34 ^c	2,96±0,26 ^c	6,50±0,23 ^d	15,82±0,65 ^d	0,496±0,022 ^c
Нефть	1,80±0,05 ^a	28,00±0,45 ^a	1,32±0,05 ^a	1,87±0,08 ^a	5,38±0,20 ^a	0,185±0,009 ^a
Нефть + УОМ 3	1,93±0,06 ^b	29,44±0,47 ^b	1,43±0,05 ^a	2,57±0,07 ^c	6,06±0,19 ^c	0,213±0,009 ^b
Нефть + ИВ С7	1,91±0,06 ^b	28,82±0,41 ^b	1,61±0,05 ^b	2,25±0,07 ^b	5,69±0,20 ^b	0,213±0,010 ^b

Примечание. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами, n=200 (p≤0,05). Обозначения вариантов как в таблице 1.

нированной почве, было в 2,2 раза меньше, чем в чистой. Оно повышалось на 22 % при интродукции штамма *P. hunanensis* ИВ С7 по сравнению с данным показателем у необработанных растений в почве с нефтью. Наиболее сильное ингибирующее действие поллютант оказывал на колос: на фоне нефтяного загрязнения длина главного колоса снизилась в 3,5 раза, а число колосков в колосе – в 2,9 раза. Применение бактерий приводило к увеличению этих параметров. Более выраженное положительное воздействие оказывал штамм *Enterobacter* sp. УОМ 3, при обработке которым длина главного колоса и число колосков в колосе увеличивались на 37 и 12 % соответственно, тогда как при использовании *P. hunanensis* ИВ С7 – на 20 и 6 % соответственно.

Внесение бактерий-деструкторов ускорило процесс разложения нефти. Так, к концу эксперимента в почве без растений интродукция штаммов *Enterobacter* sp. УОМ 3 и *P. hunanensis* ИВ С7 уменьшала содержание углеводов по сравнению с необработанным вариантом на 26 и 18 % соответственно (рис. 3). Совместное использование углеводородокисляющих микроорганизмов и растений было эффективнее на 29–33 %

по сравнению с вариантом, где растения не подвергались бактериальной обработке.

Количество гетеротрофных микроорганизмов в отсутствие растений в загрязненной почве на протяжении эксперимента оставалось на одном уровне (табл. 3). Внесение бактерий-нефтедеструкторов увеличивало данный показатель к концу испытания. В почве с растениями общая численность микроорганизмов была выше, чем в почве без растений. Интродукция штаммов *Enterobacter* sp. УОМ 3 и *P. hunanensis* ИВ С7 в контаминированную почву с растениями повышала количество гетеротрофных микроорганизмов в 1,6–2,2 раза.

Как и в случае с гетеротрофными микроорганизмами, плотность популяции УОМ в почве с нефтью без растений оставалась стабильной на протяжении опыта. Внесение углеводородокисляющих бактерий на порядок повышало численность УОМ к концу эксперимента. В вариантах с растениями этот показатель был выше приблизительно в 2–3 раза, чем в почве без растений. В целом степень деструкции углеводов коррелировала с количеством УОМ ($r = 0,45$, $p \leq 0,05$).

Численность олигонитрофильных микроорганизмов в загрязненной почве без рас-

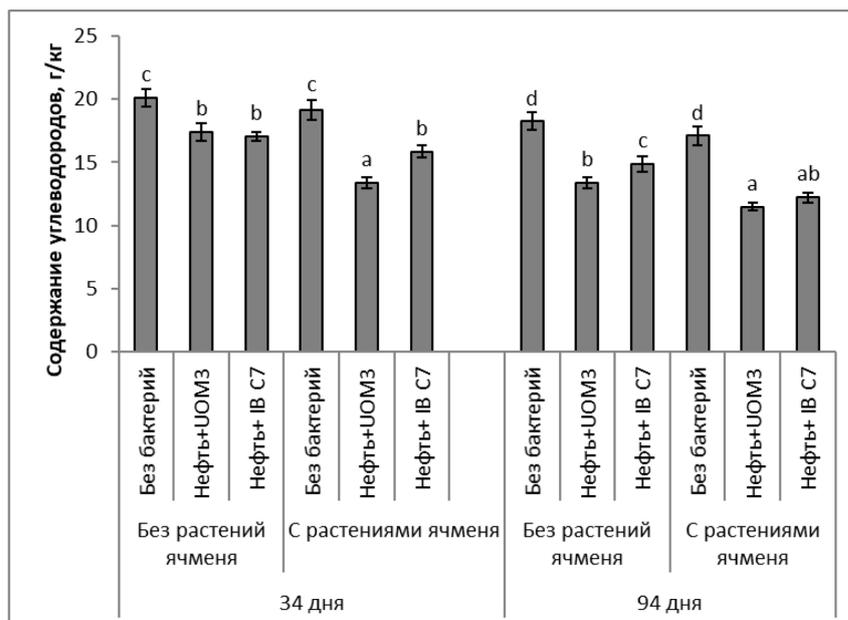


Рис. 3. Содержание углеводов в почве через 34 и 94 дня после появления всходов. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($p \leq 0,05$). Обозначения вариантов как на рис. 1.

Fig. 3. Hydrocarbon contents in the soil 34 and 94 days after germination. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ($p \leq 0.05$). Notations of treatments are the same as in Fig. 1

Таблица 3. Численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве, КОЕ/г

Table 3. The number of microorganisms in the oil contaminated soil, CFU/g

Вариант опыта		Гетеротрофные микроорганизмы, $\times 10^7$		Углеродородокисляющие микроорганизмы, $\times 10^6$		Олигонитрофильные микроорганизмы, $\times 10^5$	
		34 дня после появления всходов	94 дня после появления всходов	34 дня после появления всходов	94 дня после появления всходов	34 дня после появления всходов	94 дня после появления всходов
Без растений	Без бактерий	1,1 \pm 0,2 ^a	1,2 \pm 0,2 ^a	1,4 \pm 0,3 ^a	1,5 \pm 0,3 ^a	0,3 \pm 0,1 ^a	2,0 \pm 0,1 ^a
	UOM 3	1,6 \pm 0,4 ^{ab}	2,4 \pm 0,6 ^{bc}	7,2 \pm 1,5 ^c	13,8 \pm 3,9 ^c	2,0 \pm 0,3 ^b	9,1 \pm 1,2 ^b
	IB C7	1,6 \pm 0,2 ^{ab}	3,0 \pm 0,6 ^{bc}	6,7 \pm 2,0 ^c	14,3 \pm 3,0 ^c	1,8 \pm 0,3 ^b	10,6 \pm 1,5 ^b
С растениями	Без бактерий	1,8 \pm 0,1 ^b	2,1 \pm 0,3 ^b	2,7 \pm 0,2 ^b	3,3 \pm 0,4 ^b	1,9 \pm 0,2 ^b	8,5 \pm 0,6 ^b
	UOM 3	2,3 \pm 0,4 ^{bc}	4,6 \pm 0,4 ^d	19,3 \pm 2,9 ^d	25,5 \pm 2,9 ^d	3,9 \pm 0,5 ^c	29,9 \pm 2,3 ^d
	IB C7	3,0 \pm 0,3 ^c	3,3 \pm 0,4 ^c	21,9 \pm 2,4 ^d	29,5 \pm 3,8 ^d	4,1 \pm 0,4 ^c	20,8 \pm 2,4 ^c

Примечание. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($p \leq 0,05$). Обозначения вариантов как в таблице 1

тений и бактериализации со временем незначительно увеличивалась. При использовании обоих штаммов в вариантах эксперимента без растений количество микроорганизмов данной группы возрастало в 4,6–5,3 раза. В почве с растениями ячменя их численность была выше, чем в отсутствие растений. После внесения бактерий-нефтедеструкторов к концу эксперимента наблюдалось повышение количества олигонитрофилов в 2,4–3,5 раза по сравнению с вариантом с растениями без обработки.

Не было установлено достоверных различий в содержании ИУК в корнях ячменя без нефти и в ее присутствии (рис. 4). В вариантах, где на фоне загрязнения проводилась обработ-

ка семян штаммами *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. humanensis* IB C7, содержание ИУК в корнях растений было ниже, чем в контроле в 1,6 и 1,9 раза соответственно. В варианте без нефти ИУК было значительно больше в корнях, чем в побегах ячменя. По сравнению с контролем содержание ИУК в побегах ячменя, росшего на почве с поллютантом, увеличилось приблизительно в 3 раза.

Содержание абсцизовой кислоты в побегах во всех вариантах опыта было ниже, чем в корнях (в среднем в 2,1–6,1 раза). На фоне нефтяного загрязнения повышение уровня АБК было обнаружено только у не инокулированных растений (рис. 4). Заметнее это проявилось в корнях, где ее концентрация

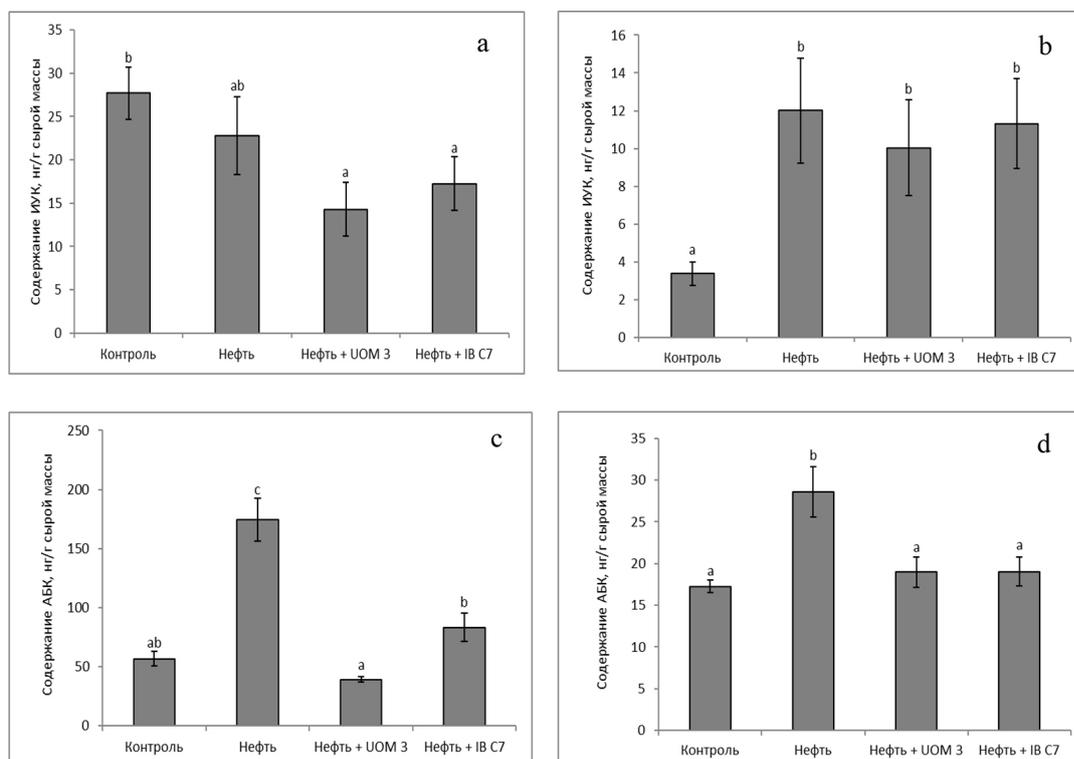


Рис. 4. Содержание индолил-3-уксусной и абсцизовой кислоты в корнях (а и с соответственно) и побегах (b и d соответственно) растений ячменя. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($n=9$, $p \leq 0,05$). Обозначения вариантов как на рис. 1.

Fig. 4. Indole-3-acetic acid and abscisic acid content in roots (a and c respectively) and shoots (b and d respectively) of barley plants. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ($n=9$, $p \leq 0.05$). Notations of treatments are the same as in Fig. 1.

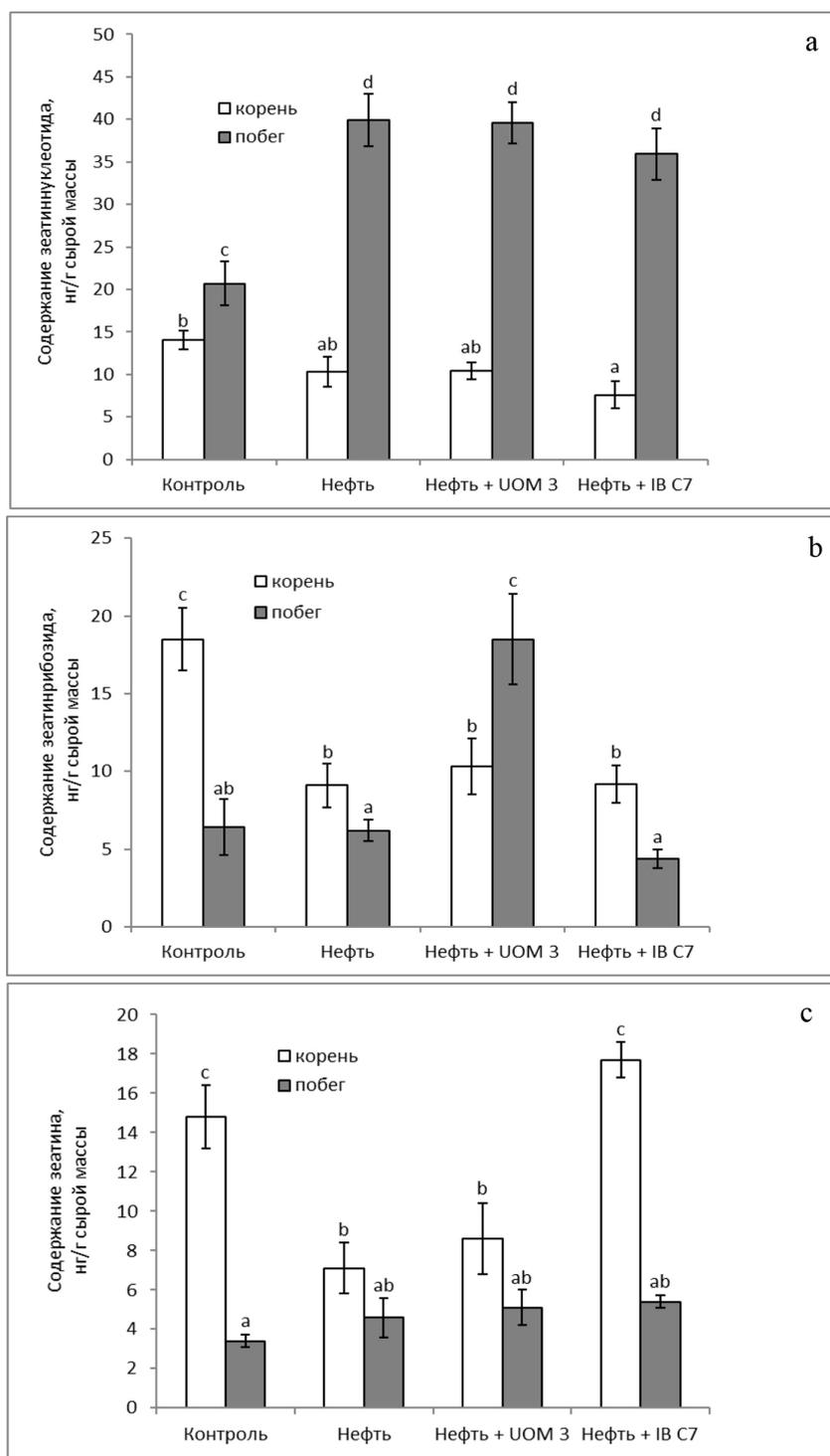


Рис. 5. Содержание зеатиннуклеотида (а), зеатинрибозида (b) и зеатина (с) в корнях и побегах растений ячменя. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($n=9$, $p \leq 0,05$). Обозначения вариантов как на рис. 1.

Fig. 5. Zeatinnucleotide (a), zeatinriboside (b), and zeatin (c) contents in roots and shoots of barley plants. Statistically different means for each indicator are marked with different letters ($n=9$, $p \leq 0.05$). Notations of treatments are the same as in Fig. 1

выросла в 3,1 раза. Использование микроорганизмов для обработки растений, высаженных на почву с нефтью, привело к тому, что значение этого показателя как в корнях, так и в побегах снизилось до уровня контроля.

Содержание всех трех анализируемых форм цитокинина в корнях растений ячменя составило в контроле 14,0–18,5 нг/г сырой массы (рис. 5). Под воздействием нефти наиболее заметно снизилось содержание зеатина и его рибозилированной формы (в 2 раза в каждом случае). Интродукция штаммов бактерий на фоне загрязнения не повлияла на уровень зеатиннуклеотида и зеатинрибозидов в корнях растений, он остался практически таким же, как и в варианте с нефтью без бактериализации. Вместе с тем растения ячменя, растущие в присутствии нефти, откликнулись на обработку штаммом *P. hunanensis* IB C7 повышением в корнях свободной формы зеатина. Содержание зеатина и зеатинрибозидов в побегах было меньше, чем в корнях во всех вариантах опыта (рис. 5), за исключением резкого (почти в 3 раза) повышения количества зеатинрибозидов при использовании

штамма *Enterobacter* sp. UOM 3 для бактериализации растений в контаминированной почве. Нефтяное загрязнение послужило толчком к накоплению в побегах зеатиннуклеотида: в растениях, высаженных на почву с нефтью, его было в 1,7–1,9 раза больше, чем в контрольных.

Содержание хлорофилла в побегах ячменя через 10 дней после появления всходов в растениях, растущих в присутствии нефти, было в 2 раза ниже, чем в контрольном варианте (табл. 4). Эта же тенденция сохранилась в дальнейшем. В тех случаях, когда растения в загрязненной почве обрабатывали штаммами бактерий, его обнаружено на 22,2–33,3 % больше, чем в варианте с нефтью, но без бактериализации.

Минимальный уровень флавоноидов выявлен у контрольных растений (табл. 4). При наличии нефти в почве у молодых растений количество флавоноидов было выше, чем в контроле в 1,6 раза, при повторном отборе – в 1,1 раза. В начале вегетации инокуляция бактериями не оказывала влияния на накопление этих пигментов. По мере дальнейшего

Таблица 4. Биохимические показатели растений ячменя

Table 4. Biochemical indicators of barley plants

Варианты опыта	Хлорофилл (мкг/см ²)	Флавоноиды (y.e.)	NBI (y.e.)	Пролин (мкг/г)
10 дней после появления всходов				
Контроль	35,1±1,0 ^c	0,56±0,02 ^a	62,7±2,0 ^f	26,4±3,3 ^a
Нефть	16,3±1,0 ^a	0,90±0,02 ^c	18,1±1,0 ^a	79,3±2,8 ^c
Нефть + UOM 3	18,4±1,0 ^{ab}	0,89±0,02 ^c	20,7±1,0 ^b	29,5±2,9 ^a
Нефть + IB C7	18,2±1,0 ^{ab}	0,87±0,02 ^c	20,9±1,0 ^b	35,5±3,2 ^a
34 дня после появления всходов				
Контроль	32,0±0,6 ^d	0,65±0,02 ^b	49,2±1,4 ^e	52,9±4,5 ^b
Нефть	18,9±0,7 ^b	0,74±0,01 ^c	24,7±1,0 ^c	115,9±4,2 ^d
Нефть + UOM 3	22,1±0,9 ^c	0,81±0,01 ^d	27,3±0,8 ^c	61,9±2,7 ^b
Нефть + IB C7	24,1±0,5 ^c	0,79±0,01 ^d	30,5±0,6 ^d	80,7±3,4 ^c

Примечание. Статистически отличающиеся средние значения для каждого показателя отмечены разными буквами ($p \leq 0,05$). Обозначения вариантов как в таблице 1

развития растений содержание флавоноидов в ячмене, растущем в почве с нефтью без обработки микроорганизмами, было ниже, чем у бактериализованных растений на 7–10 %.

Изменения в содержании хлорофилла и флавоноидов, происходящие в растениях с течением времени, а также под воздействием нефтяного загрязнения, наглядно описываются индексом азотного баланса растений, который является индикатором изменения соотношения C/N в листьях. Через 10 суток после появления всходов в условиях стресса NBI был меньше, чем в контроле в 3,0–3,5 раза, через две недели он вырос до 24,7–30,5 у.е., но по-прежнему был ниже, чем в контрольном варианте (в 1,6–1,9 раза). Наибольшего значения NBI достиг в варианте с инокуляцией растений штаммом *P. hunanensis* IB C7 (табл. 4).

Содержание пролина в побегах ячменя в контрольном варианте на начальном этапе вегетации составляло 26,4 мкг/г сырой массы (табл. 4). В присутствии нефти его количество увеличилось в 3 раза (79,3 мкг/г). Однако в вариантах, где на фоне поллютанта проводилась интродукция штаммов бактерий, количество этой аминокислоты в листьях было заметно ниже. Там, где использовался штамм *P. hunanensis* IB C7, оно составляло 35,5 мкг/г, при применении штамма *Enterobacter* sp. UOM 3 – было близко к контрольному значению. По ходу эксперимента уровень пролина увеличивался во всех вариантах опыта в среднем в 1,5–2,3 раза. При этом в случаях, где на фоне нефтяного загрязнения осуществлялась бактериальная обработка, его количество по-прежнему было значительно ниже, чем в варианте с нефтью без интродукции микроорганизмов (на 30–47 %).

Обсуждение

Известно (Skrypnik et al., 2021), что основной признак угнетающего влияния нефтяных

углеводородов на растения – это торможение их роста, которое приводит к уменьшению накопления биомассы. В наших опытах выращивание растений на нефтезагрязненных почвах также приводило к замедлению роста растений ячменя, что могло быть связано с ее непосредственным токсическим действием, вызывающим ингибирование процесса деления клеток (Macoustra et al., 2015; Itheme et al., 2017).

С другой стороны, попадание нефти в почву приводит к снижению ее влагоудерживающей способности и аэрируемости, а также к изменению ряда химических свойств, pH, доступности элементов минерального питания (Devatha et al., 2019). Все указанные причины в совокупности могли приводить к ухудшению роста и развития растений ячменя в контаминированной почве (табл. 1, 2 и рис. 1, 2).

Интродукция микроорганизмов частично компенсировала неблагоприятное воздействие загрязнителя, что очень важно при проведении биоремедиации. Вероятно, положительный эффект бактериализации проявлялся как в ускорении разложения поллютанта, так и в выработке микроорганизмами веществ, стимулирующих рост и развитие растений-фиторемедиантов (Viesser et al., 2020). Используемые в настоящем исследовании штаммы разлагают нефть, нефтепродукты и продуцируют ИУК (Четвериков и др., 2019; Вакаева et al., 2020). Обнаруженная нами ранее в лабораторных опытах способность штаммов *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. hunanensis* IB C7 к увеличению длины и массы побегов и корней на фоне углеводородного стресса (Вакаева et al., 2020; Vysotskaya et al., 2021) проявилась и в полевых условиях.

Известно, что гормоны действуют на рост и развитие растений не изолированно, а через комплекс взаимосвязанных сигналов (Bielach

et al., 2017). При этом по-прежнему до конца не выяснено, каким образом взаимное влияние этих биологически активных веществ помогает растениям справиться со стрессом. В настоящем эксперименте воздействие нефтяного загрязнения на гормональную систему растений ячменя проявлялось в повышении уровня ИУК в побегах и снижении ее содержания в корнях (рис. 4а и 4b). Такое изменение в распределении гормонов может быть результатом ингибирования их транспорта по флоэме из побега в корни. Ранее было описано, что накопление ауксинов в побегах растений и торможение их оттока в корни происходит под влиянием флавоноидов (Vuer et al., 2013; Peer et al., 2013). Увеличение содержания флавоноидов в присутствии нефти (табл. 4) может иметь отношение к регуляции распределения ауксинов в растениях ячменя. Аккумуляция ИУК в побегах могла содействовать защите растений от оксидативного стресса, сопровождающего многие неблагоприятные воздействия (Sharma et al., 2012), поскольку известна способность этого гормона активировать антиоксидантную систему (Kim et al., 2013). Несколько неожиданным было отсутствие влияния бактерий, которые были способны продуцировать ауксины *in vitro* (Четвериков и др., 2019; Вакаева et al., 2020), на содержание ИУК в растениях ячменя (рис. 4а и 4b). Возможно, что повышения ее концентрации под влиянием микроорганизмов не наблюдалось в связи с высоким уровнем флавоноидов, активирующих окислительный распад ауксинов (Vuer et al., 2013).

Присутствие в почве нефти в меньшей степени подавляло рост корней, чем побегов. Перераспределение биомассы в пользу корней – характерный ростовой ответ на дефицит воды и элементов минерального питания (Vysotskaya et al., 2009; Xu et al., 2015). Поскольку наличие загрязнителя снижает

доступность воды и ионов для растений, поддержание роста корней – важная реакция растений, обеспечивающая их адаптацию к данным стрессовым условиям. С другой стороны, развитие корневой системы существенно для колонизации ризосферы бактериями. Известно, что цитокинины способны стимулировать рост побега, но подавляют рост корней (Werner et al., 2003). В настоящем эксперименте под влиянием загрязнения наблюдалась относительная (по сравнению с побегом) активация роста корней, которая проявлялась в увеличении соотношения массы корней к массе побега (табл. 1) и сопровождалась снижением содержания цитокининов в корнях (рис. 5). В данном случае уменьшение уровня этих гормонов в подземных органах можно рассматривать как один из механизмов, обеспечивающих активацию их роста. Снижение в присутствии нефти в корнях растений ячменя содержания рибозида зеатина, являющегося транспортной формой цитокининов, может свидетельствовать о перераспределении цитокининов между корнями и побегами. Повышенное под влиянием загрязнения содержание цитокининов в побегах растений сопровождалось активацией их роста только на фоне интродукции бактерий (рис. 5). Проявлению стимуляции роста под влиянием повышенного уровня цитокининов могло помешать накопление АБК, содержание которой в отсутствие бактериализации возрастало в побегах в 1,7 раза по сравнению с растениями, которые росли в чистой почве. Как известно, АБК является антагонистом цитокининов в регуляции роста растений (Huang et al., 2018). Ее содержание снижалось под влиянием микроорганизмов *Enterobacter* sp. UOM 3 и *P. hunanensis* IB C7 до контрольных значений, приводя к увеличению соотношения общего количества цитокининов к количеству АБК в 1,4 и 1,9 раза соответственно,

что объясняет активацию роста побега под влиянием бактериализации.

Уменьшение накопления АБК в растениях было наиболее заметным проявлением влияния бактерий на гормональную систему растений. Накопление этого гормона является индикатором неблагоприятных условий для роста растений (прежде всего дефицита воды и элементов минерального питания) (He et al., 2021). Бактеризация уменьшала содержание углеводов в почве, что могло способствовать улучшению снабжения растений водой и элементами минерального питания.

Торможение роста побега в условиях дефицита воды при нефтяном загрязнении приводит к формированию более мелких листьев, что нашло свое отражение в снижении индекса листовой поверхности в 2,4 раза по сравнению с контрольными растениями в чистой почве (рис. 2). Это согласуется с нашими более ранними исследованиями (Vysotskaya et al., 2021). Инокуляция штаммами бактерий приводила к снижению содержания АБК (рис. 4c и 4d), что могло способствовать увеличению устьичной проводимости, скорости фотосинтеза и приводить к увеличению индекса листовой поверхности (рис. 2).

Показано, что углеводороды оказывают ингибирующее действие на фотосинтез и содержание хлорофилла в частности (Kreslavski et al., 2017). Содержание флавоноидов увеличивается при низкой доступности азота и, как правило, обратно пропорционально содержанию хлорофилла (Padilla et al., 2014). Поэтому соотношение между количеством хлорофилла и флавоноидов, известное как индекс азотного баланса, было предложено в качестве индикатора азотного статуса растений (Padilla et al., 2014). Растения, выращенные в нефтесодержащей почве, показали самое низкое значение NBI, значительно отличающееся от значений, полученных

в контрольных растениях (табл. 4). Некоторое повышение NBI в результате бактериализации штаммом *P. hunanensis* IB C7, возможно, связано с наличием у него азотфиксирующей способности (Bakaeva et al., 2020), однако это предположение нуждается в дальнейшем изучении.

Одной из ранних адаптивных реакций растений на неблагоприятные условия среды является увеличение ими синтеза различных низкомолекулярных соединений, например пролина. Он участвует в регуляции осмотического потенциала клеток, стабилизирует клеточную структуру и удаляет избыток АФК, тем самым повышая устойчивость растений к стрессу (Gong et al., 2020). Данные об изменении уровня этой аминокислоты в растениях при различных концентрациях нефти в почве достаточно противоречивы и определяются как типом загрязнителя, так и видом (и даже сортом) растений (Skrypnik et al., 2021). В настоящем эксперименте наличие нефти приводило к резкому увеличению его содержания в листьях по сравнению с контролем (табл. 4). Снижение количества пролина в результате бактериализации говорит о том, что внесение штаммов-нефтедеструкторов уменьшает уровень абиотического стресса, вызванного присутствием токсических веществ в почве.

Интродукция углеводородокисляющих бактерий заметно усиливала разложение люлютанта (рис. 3), что, вероятно, связано с хорошей приживаемостью и активным функционированием привнесенной микробной популяции. Одновременное использование растений и бактерий привело к ускорению деградации углеводов в почве по сравнению с вариантами без растений. Это объясняется увеличением микробной биомассы в ризосфере растений (табл. 3), корневая система которых за счет выделения биологически ак-

тивных веществ создает комфортную среду для роста микроорганизмов (Rohrbacher, St-Arnaud, 2016; Chetverikov et al., 2021). Кроме того, развитие корней улучшает аэрацию почвы за счет создания воздушных каналов, что важно для аэробной микробиоты.

Значительный вклад в численность гетеротрофных микроорганизмов в почве вносили углеводородокисляющие микроорганизмы (табл. 3). Это подтверждает одинаковая тенденция по изменению количества обеих эколого-трофических групп (коэффициент корреляции $r = 0,981$, $p \leq 0,5$). Отмечено увеличение со временем пула олигонитрофильных микроорганизмов, наиболее заметное в вариантах с интродукцией штаммов. Очевидно, это было связано с уменьшением токсичности почвы вследствие снижения содержания в ней нефти (как в результате испарения, так и биологического разложения), поскольку данная группа микроорганизмов является чувствительной к загрязнению различными

поллютантами, в том числе углеводородами (Tomkiel et al., 2018).

Заключение

В ходе полевого эксперимента показано, что на фоне нефтяного загрязнения одновременное использование ауксинпродуцирующих бактерий-нефтедеструкторов *P. hunanensis* IB C7 и *Enterobacter* sp. UOM 3 и растений ячменя способствует более значительному снижению содержания углеводородов в почве по сравнению с применением бактерий и растений по отдельности. Установлено положительное влияние бактериализации на рост растений ячменя, что очень важно при проведении биоремедиации. Обработка микроорганизмами смягчала для растений отрицательные последствия абиотического стресса, вызванного присутствием нефти в почве, за счет влияния, оказываемого на гормональный статус растений, а также на системы осморегуляции и фотосинтеза.

Список литературы / References

Веселов С. Ю. (1998) *Использование антител для количественного определения, очистки и локализации регуляторов роста*. Уфа, БашГУ, 138 с. [Veselov S. Yu. (1998) *Use of antibodies to quantify, purify, and localize growth regulators*. Ufa, Bashkir State University, 138 p. (in Russian)]

Высоцкая Л. Б., Архипова Т. Н., Кузина Е. В., Рафикова Г. Ф., Ахтямова З. А., Иванов Р. С., Тимергалина Л. Н., Кудоярова Г. Р. (2019) Сравнение реакции растений различных видов на нефтяное загрязнение. *Биомика*, 11(1): 86–100 [Vysotskaya L. B., Arkhipova T. N., Kuzina E. V., Rafikova G. F., Akhtyamova Z. A., Ivanov R. S., Timergalina L. N., Kudoyarova G. R. (2019) Comparison of responses of different plant species to oil pollution. *Biotics* [Biomika], 11(1): 86–100 (in Russian)]

Дзержинская И. С. (2008) *Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов*. Астрахань, АГТУ, 348 с. [Dzerzhinskaya I. S. (2008) *Culture media for the isolation and cultivation of microorganisms*. Astrakhan, Astrakhan State Technical University, 348 p. (in Russian)]

ПНД Ф 16.1.41–04 *Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом* (2004) М., МПР, 12 с. [State environmental normative document 16.1.41–04 *Methods for measuring the mass concentration of oil products in soil samples by the gravimetric method* (2004) Moscow, Department of Natural Resources, 12 p. (in Russian)]

Четвериков С. П., Бакаева М. Д., Коршунова Т. Ю., Кузина Е. В., Рафикова Г. Ф., Четверикова Д. В., Высоцкая Л. Б., Логинов О. Н. (2019) Новый штамм *Enterobacter* sp. UOM 3 – деструктор

нефти и продуцент индолилуксусной кислоты. *Естественные и технические науки*, 7: 37–40 [Chetverikov S. P., Bakaeva M. D., Korshunova T. Y., Kuzina E. V., Rafikova G. F., Chetverikova D. V., Vysotskaya L. B., Loginov O. N. (2019) New strain *Enterobacter* sp. UOM 3 – destructor of oil and producer of indole acetic acid. *Natural and Technical Sciences* [Estestvennyye i tekhnicheskije nauki], 7: 37–40 (in Russian)]

Arkhipova T., Martynenko E., Sharipova G., Kuzmina L., Ivanov I., Garipova M., Kudoyarova G. (2020) Effects of plant growth promoting rhizobacteria on the content of abscisic acid and salt resistance of wheat plants. *Plants*, 9(11): 1429

Bakaeva M., Kuzina E., Vysotskaya L., Kudoyarova G., Arkhipova T., Rafikova G., Chetverikov S., Korshunova T., Chetverikova D., Loginov O. (2020) Capacity of *Pseudomonas* strains to degrade hydrocarbons, produce auxins and maintain plant growth under normal conditions and in the presence of petroleum contaminants. *Plants*, 9(3): 379

Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39(1): 205–207

Bielach A., Hrtyan M., Tognetti V. B. (2017) Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7): 1427

Buer C. S., Kordbacheh F., Truong T. T., Hocart C. H., Djordjevic M. A. (2013) Alteration of flavonoid accumulation patterns in transparent testa mutants disturbs auxin transport, gravity responses, and imparts long-term effects on root and shoot architecture. *Planta*, 238(1): 171–189

Chetverikov S., Vysotskaya L., Kuzina E., Arkhipova T., Bakaeva M., Rafikova G., Korshunova T., Chetverikova D., Hkudaygulov G., Kudoyarova G. (2021) Effects of association of barley plants with hydrocarbon-degrading bacteria on the content of soluble organic compounds in clean and oil-contaminated sand. *Plants*, 10(5): 975

Devatha C. P., Vishnu Vishal A., Purna Chandra Rao J. (2019) Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Applied Water Science*, 9: 89

Gkorezis P., Daghighi M., Franzetti A., Van Hamme J. D., Sillen W., Vangronsveld J. (2016) The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1836

Gong Z., Chen W., Bao G., Sun J., Ding X., Fan C. (2020) Physiological response of *Secale cereale* L. seedlings under freezing-thawing and alkaline salt stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(2): 1499–1507

Habib S. H., Kausar H., Saud H. M. (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed Research International*, 2016: 6284547

He Y., Liu Y., Li M., Lamin-Samu A. T., Yang D., Yu X., Izhar M., Jan I., Ali M., Lu G. (2021) The *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA32 protein regulates ABA-mediated responses to drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 12: 625493

Huang X., Hou L., Meng J., You H., Li Z., Gong Z., Yang S., Shi Y. (2018) The antagonistic action of abscisic acid and cytokinin signaling mediates drought stress response in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 11(7): 970–982

Theme P. O., Akinola M. O., Njoku K. L. (2017) Evaluation on the growth response of Peanut (*Arachis hypogaea*) and Sorghum (*Sorghum bicolor*) to crude oil contaminated soil. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 21(6): 1169–1173

Kim J.I., Baek D., Park H.C., Chun H.J., Oh D.H., Lee M.K., Cha J.Y., Kim W.Y., Kim M.C., Chung W.S., Bohnert H.J., Lee S.Y., Bressan R.A., Lee S.W., Yun D.J. (2013) Overexpression of *Arabidopsis* YUCCA6 in potato results in high-auxin developmental phenotypes and enhanced resistance to water deficit. *Molecular Plant*, 6(2): 337–349

Korshunova T. Yu., Chetverikov S.P., Bakaeva M.D., Kuzina E.V., Rafikova G.F., Chetverikova D.V., Loginov O.N. (2019) Microorganisms in the elimination of oil pollution consequences (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(4): 344–354

Koshlaf E., Ball A. S. (2017) Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, 3(1): 25–49

Kreslavski V.D., Brestic M., Zharmukhamedov S.K., Lyubimov V.Y., Lankin A.V., Jajoo A., Allakhverdiev S.I. (2017) Mechanisms of inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in photosynthetic primary processes in pea leaves and thylakoid preparations. *Plant Biology*, 19(5): 683–688

Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L. Yu., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Y. (2017) Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(11): 253

Kudoyarova G.R., Melentiev A.I., Martynenko E.V., Timergalina L.N., Arkhipova T.N., Shendel G.V., Kuz'mina L.Y., Dodd I.C., Veselov S.Y. (2014) Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83: 285–291

Macoustra G.K., King C.K., Wasley J., Robinson S.A., Jolley D.F. (2015) Impact of hydrocarbons from a diesel fuel on the germination and early growth of subantarctic plants. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(7): 1238–1248

Muratova A., Dubrovskaya E., Golubev S., Grinev V., Chernyshova M., Turkovskaya O. (2015) The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 188: 1–8

Padilla F.M., Pena-Fleitas M.T., Gallardo M., Thompson R.B. (2014) Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *European Journal of Agronomy*, 58: 39–52

Peer W.A., Cheng Y., Murphy A.S. (2013) Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *Journal of Experimental Botany*, 64(9): 2629–2639

Raymond R.L. (1961) Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Developments in Industrial Microbiology*, 2(1): 23–32

Rohrbacher F., St-Arnaud M. (2016) Root exudation: the ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation. *Agronomy*, 6(1): 19

Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012: 217037

Skrypnik L., Maslennikov P., Novikova A., Kozhikin M. (2021) Effect of crude oil on growth, oxidative stress and response of antioxidative system of two rye (*Secale cereale* L.) varieties. *Plants*, 10(1): 157

Tomkiel M., Baćmaga M., Borowik A., Wyszowska J., Kucharski J. (2018) The sensitivity of soil enzymes, microorganisms and spring wheat to soil contamination with carfentrazone-ethyl. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, 53(2): 97–107

Veselov S. Y., Kudoyarova G. R., Egutkin N. L., Gyuli-Zade V.Z., Mustafina A. R., Kof E. M. (1992) Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum*, 86(1): 93–96

Viesser J. A., Sugai-Guerios M.H., Malucelli L. C., Pincerati M. R., Karp S. G., Maranhão L. T. (2020) Petroleum-tolerant rhizospheric bacteria: isolation, characterization and bioremediation potential. *Scientific Reports*, 10(1): 2060

Vysotskaya L. B., Korobova A. V., Veselov S. Y., Dodd I. C., Kudoyarova G. R. (2009) ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat. *Functional Plant Biology*, 36(1): 66–72

Vysotskaya L. B., Kudoyarova G. R., Arkhipova T. N., Kuzina E. V., Rafikova G. F., Akhtyamova Z. A., Ivanov R. S., Chetverikov S. P., Chetverikova D. V., Bakaeva M. D., Korshunova T. Yu., Loginov O. N. (2021) The influence of the association of barley plants with petroleum degrading bacteria on the hormone content, growth and photosynthesis of barley plants grown in the oil-contaminated soil. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(4): 67

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmulling T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, 15(11): 2532–2550

Xu W., Cui K., Xu A., Nie L., Huang J., Peng S. (2015) Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2): 9

DOI 10.17516/1997-1389-0391

EDN: SICSZU

УДК 577.332.23:539.199

Content of Lipid Peroxydation Products, Activity of Antioxidant Enzymes, and Intensity of Light Emission of Basidiomycete *Neonothopanus nambi* under Stress after Mechanical Damage

Natalya A. Tyulkova* and **Vladimir S. Bondar**
*Institute of Biophysics of the Federal Research Center
«Krasnoyarsk Science Center SB RAS»
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 10.06.2021, received in revised form 29.01.2022, accepted 25.05.2022

Abstract. The luminous basidiomycete *Neonothopanus nambi* was used to demonstrate the relationship between intensity of ROS-induced oxidative processes, efficiency of the functioning of antioxidant system enzymes, and the level of light emission of the fungus under stress. Development of oxidative stress after mechanical damage to the mycelium of the fungus was accompanied by a significant (several orders of magnitude) increase in intensity of its glow. At the maximum level of light emission of *N. nambi* mycelium, the activity of enzymes involved in the metabolism of ROS was decreased: the activity of peroxidase and superoxide dismutase to a large extent and the activity of catalase to a lesser extent. The extracts from the biomass of the brightly glowing mycelium were found to contain significantly decreased contents of primary and final products of lipid peroxydation (LP): diethenoid conjugates and Schiff bases. The findings of this study suggest that the increase in the level of bioluminescence of the fungus under stress serves as a compensatory mechanism protecting it against damage by an excessive pool of ROS (mainly H₂O₂ and other peroxide compounds), which are neutralized in the reaction of light emission, preventing the development of free radical oxidation processes, LP in particular.

Keywords: luminous fungi, reactive oxygen species, antioxidant enzymes, diethenoid conjugates, Schiff bases, oxidative stress.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: n.tyulkova2011@yandex.ru

ORCID: 0000-0003-1555-6514 (Bondar V.)

Citation: Tyulkova N. A., Bondar V. S. Content of lipid peroxydation products, activity of antioxidant enzymes, and intensity of light emission of basidiomycete *Neonothopanus nambi* under stress after mechanical damage. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(3), 333–346. DOI: 10.17516/1997-1389-0391



**Содержание продуктов перекисного окисления липидов,
активность антиоксидантных ферментов
и интенсивность световой эмиссии
базидиомицета *Neonothopanus nambi*
при стрессе после механического повреждения**

Н. А. Тюлькова, В. С. Бондарь
*Институт биофизики
Федерального исследовательского центра
«Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. На примере светящегося базидиомицета *Neonothopanus nambi* продемонстрирована взаимосвязь между интенсивностью АФК-индуцированных окислительных процессов, эффективностью функционирования ферментов антиоксидантной системы и уровнем световой эмиссии гриба в условиях стресса. Установлено, что развитие оксидативного стресса после механического повреждения мицелия гриба сопровождается значительным (на порядки) увеличением интенсивности его свечения. Показано, что при максимальном уровне световой эмиссии мицелия *N. nambi* в нем регистрируется снижение активности ферментов, участвующих в метаболизме АФК – в значительной степени пероксидаз и супероксиддисмутазы, в меньшей степени каталазы. В экстрактах из биомассы ярко светящегося мицелия обнаружено существенное снижение содержания первичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов и оснований Шиффа. Полученные данные позволяют рассматривать возрастание уровня биолюминесценции гриба при стрессе в качестве компенсаторного механизма его защиты от повреждения избыточным пулом АФК (в первую очередь H_2O_2 и других пероксидных соединений), которые нейтрализуются в реакции светоизлучения, что препятствует развитию процессов свободнорадикального окисления, в частности ПОЛ.

Ключевые слова: светящиеся высшие грибы, активные формы кислорода, антиоксидантные ферменты, диеновые конъюгаты, основания Шиффа, окислительный стресс.

Цитирование: Тюлькова, Н. А. Содержание продуктов перекисного окисления липидов, активность антиоксидантных ферментов и интенсивность световой эмиссии базидиомицета *Neonothopanus nambi* при стрессе после механического повреждения / Н. А. Тюлькова, В. С. Бондарь // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 333–346. DOI: 10.17516/1997-1389-0391

Введение

Видимое в темноте невооруженным глазом яркое свечение многих видов высших грибов является широко распространенным природным явлением (Harvey, 1952, 1957; Johnson, Haneda, 1966; Shimomura, 2006; Desjardin et al., 2008; Bondar et al., 2012a). Несмотря на значительные успехи, достигнутые в исследованиях биолюминесценции высших грибов за последнее десятилетие (Bondar et al., 2014; Purto et al., 2015; Kotlobay et al., 2018; Oba et al., 2017; Kaskova et al., 2017; Puzyr et al., 2019; Garcia-Igiera et al., 2020), тем не менее некоторые биохимические аспекты этого феномена не до конца понятны и требуют дальнейшего изучения. В частности, не совсем ясны те метаболические процессы, которые сопровождаются видимым свечением базидиомицетов (Gitelson et al., 2012).

Изучение особенностей биолюминесценции разных видов высших грибов позволило нам развить высказанную ранее идею (Shimomura, 1992; Shimomura et al., 1993) об участии активных форм кислорода (АФК) и ферментов с оксидазной функцией в механизмах излучения света этими живыми организмами (Bondar et al., 2011, 2012a, b). Хорошо известно, что происходящие в биообъектах процессы свободнорадикального окисления контролируются ферментативными и не ферментативными механизмами, обеспечивающими низкий стационарный уровень АФК, свободных радикалов и молекулярных продуктов окисления с их участием (Vladimirov, 1994; Halliwell, Gutteridge, 1999). При этом гомеостаз АФК, необходимый для жизнедеятельности клетки, обеспечивается сбалансированным функционированием про- и антиоксидантной систем (Vladimirov, Proskurnina, 2009).

Общеизвестно, что воздействие на биологические объекты стрессовых факторов разной природы (физических, химических, биологических) вызывает в них образование избыточ-

ного уровня АФК (Vladimirov, 1994; Halliwell, Gutteridge, 1999; Apel, Hirt, 2004; Jaspers, Kangasjarvi, 2010). В свою очередь, генерация большого количества АФК может инициировать развитие оксидативного стресса и разветвленные цепи окислительных реакций (в том числе перекисное окисление липидов – ПОЛ), приводящих к повреждениям биомакромолекул (белки, ДНК), клеточных структур и в конечном итоге гибели клетки (Vladimirov, Proskurnina, 2009; Yin et al., 2011). Хорошо известно, что ключевую роль в защите живых организмов от повреждающего действия АФК выполняет антиоксидантная система, которая включает участвующие в метаболизме АФК ферменты (прежде всего, супероксиддисмутаза, каталазы и пероксидазы) и низкомолекулярные соединения (токоферол, аскорбиновая кислота, флавоноиды, восстановленный глутатион, и т.д.), взаимодействующие с активными радикалами (Vladimirov, 1994; Halliwell, Gutteridge, 1999; Vladimirov et al., 2009). Функционирование данной системы нейтрализует избыток АФК и обеспечивает защиту биологических структур клетки, препятствуя окислению внутриклеточных органических соединений и участвуя в детоксикации вторичных метаболитов (Apel, Hirt, 2004).

Следует отметить, что в исследованиях светящихся базидиомицетов *Neonothopanus nambi* и *Armillaria borealis* мы обнаружили многократное усиление их световой эмиссии при воздействии разных стрессовых факторов – инкубация в деионизованной воде, механическое повреждение, радиационное излучение (Bondar et al., 2011, 2013; Medvedeva et al., 2014; Kobzeva et al., 2014; Mogilnaya et al., 2015, 2016). Это позволило высказать гипотезу, что светоизлучение высших грибов может являться дополнительным механизмом защиты от повреждающего действия избытком АФК при стрессе (Bondar et al., 2015; Mogilnaya et al., 2015, 2016). Такая ги-

потеза правомочна, поскольку идея о защитной роли биолуминесценции от повреждения живых организмов активными радикалами кислорода была высказана в середине прошлого века (McElroy, Strehler, 1949; McElroy, Seliger, 1961) и получила развитие в ряде дальнейших исследований (Watanabe et al., 1993; Barros, Bechara, 1998; Szpilewska et al., 2003; Katsev et al., 2004).

Совокупность изложенных фактов свидетельствует, что исследования, направленные на выявление взаимосвязей между интенсивностью окислительных процессов с участием АФК, эффективностью функционирования антиоксидантной системы и уровнем световой эмиссии, имеют фундаментальное значение для развития представлений о механизмах свечения высших грибов.

Настоящая работа посвящена изучению интенсивности свечения мицелия базидиомицета *Neonothopanus nambi*, активности его антиоксидантных ферментов и накопления продуктов перекисного окисления липидов в условиях стресса после механического повреждения.

Материалы и методы

В исследованиях использовали образцы пленочного мицелия базидиомицета *N. nambi* IBSO 2391 из Коллекции микроорганизмов (CCIBSO 836) ИБФ СО РАН, который выращивали в чашках Петри на жидкой питательной картофельно-сахарозной среде (200 г картофеля, 20 г сахарозы, 1 л дистиллированной воды) разработанным ранее способом (Bondar et al., 2011). Культивирование гриба проводили в темноте при температуре 26 °С в течение 8–10 суток. Для экспериментов из полученного пленочного мицелия высекали диски диаметром 12 мм, которые помещали в свежую питательную картофельно-сахарозную среду и инкубировали в ней при температуре 22–23 °С в течение 4–5 часов. Это позволяло оценить

эффект механического повреждения мицелия на интенсивность его свечения, уровень активности ферментов, участвующих в метаболизме АФК, и уровень ПОЛ.

В ходе инкубации дисков мицелия *N. nambi* через каждые 30 мин регистрировали интенсивность их свечения на люминометре Glomax 20/20 (Promega, США) со скоростью 1 измерение в 1 секунду. Уровень световой эмиссии выражали в относительных люминесцентных единицах (RLU). В сравнительных экспериментах оценивали также уровень свечения гриба при инкубации дисков мицелия в питательной среде, содержащей нитросиний тетразолий (НСТ) (Sigma, США) в концентрациях 0,01, 0,05 и 0,1 % соответственно. Для определения активности антиоксидантных ферментов в механически поврежденном грибе через определенные промежутки времени часть дисков мицелия извлекали из питательной среды и промывали деионизированной (DI) водой (Milli-Q system, Millipore, США) для удаления остатков питательной среды и метаболитов. Экстракты, содержащие изучаемые ферменты, получали при механическом разрушении мицелия в 2 мл DI воды с помощью гомогенизатора (система стекло-стекло) с последующим удалением клеточных обломков центрифугированием (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Германия) при 16000 g в течение 15 мин при 10 °С.

Уровни активности участвующих в метаболизме АФК ферментов в экстрактах мицелия *N. nambi* оценивали следующим образом. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом, изложенным в работе Polesskaya et al. (2004). При этом реакционная смесь содержала: 0,9 мл 0,05 М К/Na-фосфатного буфера (рН 7,8), 0,5 мл 0,05 % раствора НСТ, 20 мкл 0,24 % раствора Na-ЭДТА и 100 мкл экстракта. Реакцию инициировали добавлением 20 мкл 0,025 % рибофлавина. Активность каталазы тестировали методом Aebi (1984). В данном

случае реакционная смесь включала: 1,0 мл 0,05 М К/Na-фосфатного буфера (рН 7,0) и 10 мкл экстракта мицелия. Реакцию запускали внесением в реакционную смесь 10 мкл 0,6 М перекиси водорода. Общую пероксидазную активность определяли методом Wi et al. (2012), используя реакционную смесь, которая содержала: 750 мкл 0,1 М ацетатного буфера (рН 4,6), 100 мкл 0,33 М раствора орто-фенилендиамина, 100 мкл 0,05 М раствора перекиси водорода и 50 мкл экстракта. Уровни активности СОД, каталазы и общей пероксидазной активности оценивали по образованию продуктов катализируемых ими реакций, выход которых регистрировали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) по величине поглощения при длинах волн 560, 240 и 420 нм соответственно. Активность ферментов выражали в относительных единицах оптической плотности на 1 г сырой биомассы.

Интенсивность ПОЛ в механически поврежденном мицелии *N. nambi* оценивали по содержанию первичных и конечных продуктов – диеновых конъюгатов (ДК) и оснований Шиффа (ОШ) соответственно. Для этого часть инкубируемых дисков мицелия извлекали из питательной среды через определенные промежутки времени и промывали DI водой, после чего замораживали, лиофилизовали и определяли вес сухой биомассы каждого образца. При количественной оценке уровня ДК липидные компоненты из высушенной биомассы мицелия экстрагировали смесью растворителей гептан-изопропанол (соотношение 1:1, v/v) с последующим разделением фаз, в соответствии с методом (Placer, 1968; Хышиктуев и др., 1996). Авторы данного метода показали, что уровни содержания ДК в фазах гептана и изопропанола отражают интенсивность происходящих в биологическом образце процессов перекисного окисления нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно. Содержание ДК в разделенных фазах экстракта определяли

спектрофотометрически (UV-1800) по величине поглощения при длине волны 232 нм и выражали в единицах оптической плотности (OD) на 1 г сухой биомассы. При оценке уровня ОШ экстракцию липидных компонентов из сухого мицелия *N. nambi* проводили смесью растворителей хлороформ-метанол (соотношение 2:1, v/v) по методу Fletcher et al. (1973). Содержание ОШ в полученных экстрактах определяли по величине их флуоресценции (спектрофлуориметр Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, США), регистрируемой в диапазоне длин волн 400–600 нм после возбуждения облучением при длине волны 360 нм, и выражали в единицах максимальной световой эмиссии на 1 г сухой биомассы.

В сравнительных исследованиях в качестве контроля использовали диски мицелия *N. nambi*, которые не инкубировали в питательной среде. Сразу после высечения из пленочного мицелия и измерения интенсивности свечения контрольных дисков из них получали экстракты для определения активности антиоксидантных ферментов и содержания продуктов ПОЛ (ДК и ОШ), как это изложено выше.

Эксперименты для определения каждого из изучаемых показателей проводили в четырех-пяти повторах (n). Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с помощью стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические (M) со стандартным отклонением (\pm SD). Сравнительный анализ на достоверность различий между средними значениями контрольных и опытных данных проводили с помощью критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U test), различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В экспериментах было показано, что в ходе инкубации механически поврежденного мице-

лия *N. nambi* в питательной среде наблюдается значительное увеличение уровня его свечения (рис. 1). Из представленных данных видно, что интенсивность световой эмиссии дисков мицелия уже в течение 3–4 часов инкубации может возрастать по сравнению с исходным уровнем на несколько порядков – от $6,6 \cdot 10^6$ до $1,8 \cdot 10^9$ RLU. Эти данные согласуются с результатами наших предыдущих исследований, в которых было показано, что механическое повреждение мицелия базидиомицета *N. nambi* сопровождается значительным увеличением его свечения (Bondar et al., 2011; Kobzeva et al., 2014;

Medvedeva et al., 2014). При этом был обнаружен дозозависимый эффект подавления световой эмиссии инкубируемого мицелия (рис. 1) добавками НСТ от 0,01 до 0,1 %. Поскольку известно, что НСТ является ловушкой супероксид анион-радикала (Peskin, Winterbourn, 2000), наблюдаемое ингибирование свечения указывает на образование этой АФК в механически поврежденном мицелии *N. nambi*. В пользу активного образования супероксид анион-радикала и иных форм АФК в поврежденном мицелии свидетельствуют также результаты его визуально наблюдаемого синего окраши-

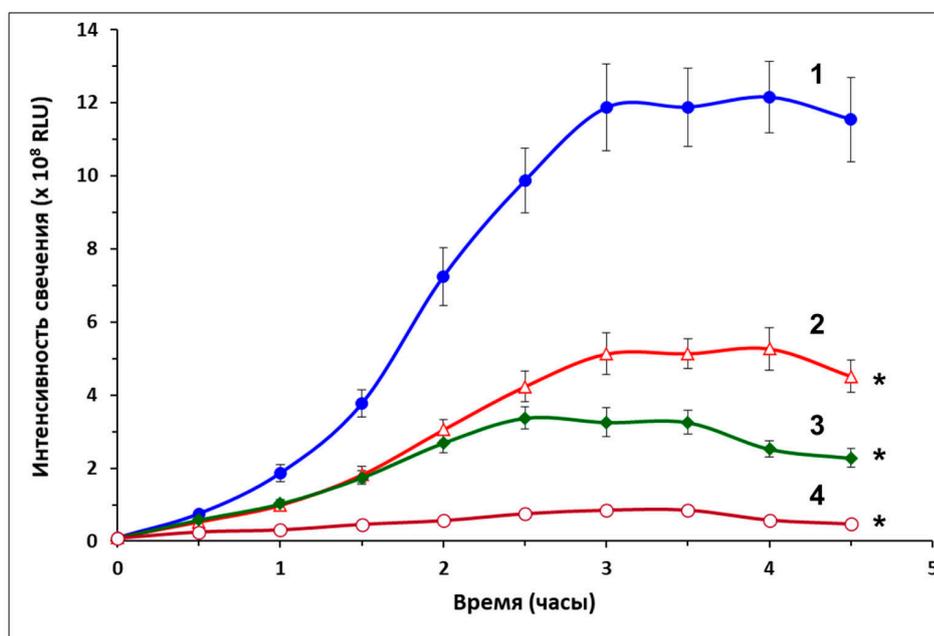


Рис. 1. Интенсивность свечения механически поврежденного мицелия базидиомицета *N. nambi* в зависимости от времени его инкубации в питательной среде: 1 – контроль (без каких-либо добавок), 2–4 – добавки в среду инкубации нитросинего тетразолия до концентрации 0,01, 0,05 и 0,1% соответственно. За нулевое значение принят уровень свечения образцов, зарегистрированный сразу после повреждения мицелия. Представлены средние значения интенсивности свечения ($M \pm SD$) из 5 независимых определений. Здесь и на последующих рисунках достоверные различия ($p < 0,05$) между средними значениями контрольных и опытных данных отмечены значком (*)

Fig. 1. The luminescence intensity of mechanically damaged mycelium of basidiomycete *N. nambi*, as dependent on the time of its incubation in a nutrient medium: 1 - control (without any additives), 2–4 – with nitro blue tetrazolium added to the incubation medium to a concentration of 0.01, 0.05 and 0.1%, respectively. The luminescence level of the samples recorded immediately after damage to the mycelium is taken as zero. The average values of the luminous intensity ($M \pm SD$) from 5 independent determinations are presented. Here and in the following figures, significant differences ($p < 0.05$) between the mean values of the control and experimental data are marked with an asterisk (*)

вания, которое нарастает в ходе инкубации дисков в питательной среде, содержащей 0,1 % НСТ (рис. 2). Хорошо известно, что взаимодействие НСТ с активными радикалами кислорода и прежде всего с супероксид анион-радикалом сопровождается образованием диформаза, имеющего темно-синий цвет (Anderson, Deinard, 1974). В свою очередь, известно, что супероксид анион-радикал является первичным радикалом и инициирует сложный механизм образования иных реакционно-активных АФК – пероксида водорода и гидроксил иона, стимулирующих разветвленные цепи окисления липидов и развитие ПОЛ (Vladimirov, Proskurnina, 2009).

С одной стороны, представленные данные (рис. 1 и рис. 2) согласуются с общепринятыми представлениями о механизме возникновения и развития оксидативного стресса и указывают на интенсивное образование АФК в механически поврежденном мицелии базидиомицета *N. nambi*. В то же время они свидетельствуют в пользу участия АФК в механизме свечения высших грибов и стимуляции грибного свечения при интенсивном образовании радикалов кислорода в условиях стресса. В частности, мы предполагаем, что этот эффект обеспечивается активным образованием в поврежденном грибе

пероксида водорода. Ранее мы показали, что этот кислородный радикал стимулирует свечение мицелия гриба *N. nambi* и выделенной из него люминесцентной системы (Bondar et al., 2011, 2014). При этом выявленное в эксперименте ингибирующее действие НСТ может быть вызвано нейтрализацией образующегося в грибе при стрессе супероксид анион-радикала и невозможностью его дальнейшей трансформации в иные формы АФК, что может осуществляться неферментативно за счет спонтанной дисмутации в кислород и пероксид водорода и/или ферментативно под действием СОД (Vladimirov, Proskurnina, 2009).

Как показали исследования, при максимальной интенсивности свечения мицелия *N. nambi*, которое наблюдается через 3–4,5 часа после механического повреждения (рис. 1), в нем регистрируется существенное снижение общей пероксидазной активности и активности СОД (более чем в 2 и 1,5 раза соответственно, через 3,5 часа инкубации), по сравнению с исходным уровнем активности этих ферментов (рис. 3). При этом было показано, что уровень каталазы в мицелии снижался в значительно меньшей степени (примерно на 7–10 %). Из представленных данных (рис. 1 и рис. 3) следует, что высо-

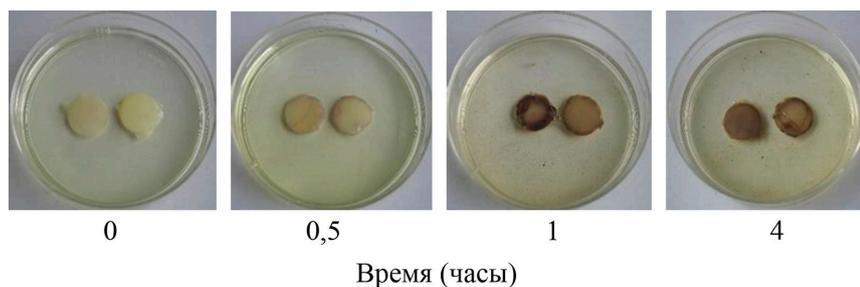


Рис. 2. Динамика изменения цвета дисков мицелия *N. nambi* в ходе их инкубации в питательной среде с добавлением 0,1% нитросинего тетразолия, отражающая процесс образования диформаза при взаимодействии красителя с активными радикалами кислорода. За нулевое значение принят момент помещения дисков в инкубационную среду

Fig. 2. The dynamics of changes in color of *N. nambi* mycelium discs incubated in a nutrient medium supplemented with 0.1% nitro blue tetrazolium, reflecting process of diformazan formation during interaction of the dye with active oxygen radicals. The moment of placing the discs in the incubation medium is taken as zero

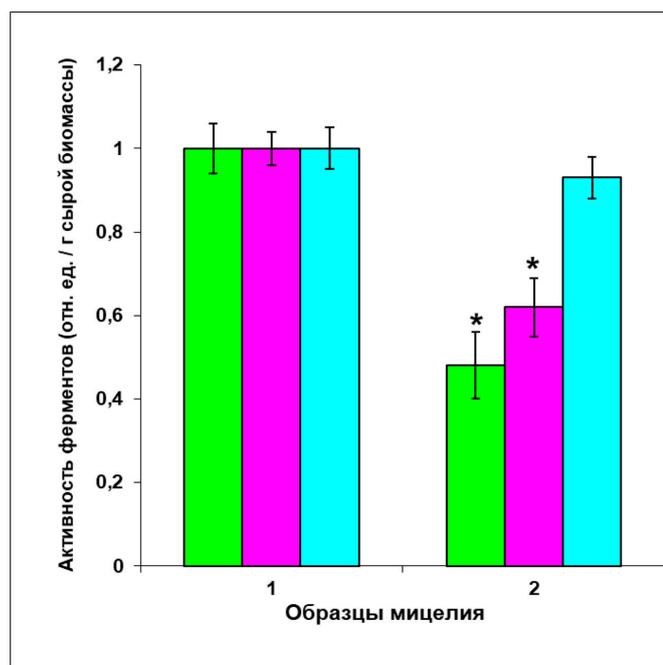


Рис. 3. Уровень активности ферментов-антиоксидантов у базидиомицета *N. namby* после его механического повреждения – сразу после высечения дисков мицелия (1) и на максимуме их световой эмиссии при инкубации в питательной среде в течение 3,5 часов (2): общая пероксидазная активность (зеленые столбцы), активность СОД (сиреневые столбцы), активность каталазы (голубые столбцы). Показания в рядах измерений нормированы на значения активности изучаемых ферментов в начальный момент после механического повреждения мицелия. Здесь и на рис. 4 данные представлены в виде $M \pm SD$, при $n = 5$ для каждого определения

Fig. 3. The level of activity of antioxidant enzymes in mechanically damaged basidiomycete *N. namby* – immediately after excision of mycelium discs (1) and at the maximum of their light emission during 3.5-hour incubation in a nutrient medium (2): total peroxidase activity (green columns), SOD activity (purple columns), catalase activity (blue columns). Indications in series of measurements are normalized to the values of the activity of the studied enzymes at the initial moment after mechanical damage to the mycelium. Here and in Fig. 4 the data are presented as $M \pm SD$, where $n = 5$ for each determination

кий уровень световой эмиссии поврежденного мицелия наблюдается на фоне значительного снижения активности участвующих в метаболизме АФК ферментов (пероксидаз и СОД). С одной стороны, это свидетельствует о том, что на начальном этапе развития оксидативного стресса ферменты антиоксидантной защиты гриба могут подвергаться инактивации (или деградации) высокотоксичными радикалами кислорода, прежде всего пероксинитритом и гидроксил-радикалом. Известно, что эти радикалы могут образоваться при взаимодействии супероксида с монооксидом азота, син-

тезируемым митохондриальной NO-синтазой, и трехвалентным железом ферритина и железосерных комплексов цепей переноса электронов (Vladimirov et al., 2009; Vladimirov, Proskurnina, 2009). В то же время результаты проведенных исследований (рис. 1 и рис. 3) позволяют предполагать, что в начальный период развития стресса эффективность функционирования классической антиоксидантной системы гриба может снижаться. В этом случае значительное увеличение уровня световой эмиссии мицелия можно рассматривать как дополнительный (компенсаторный) механизм защиты гриба

от повреждения избытком АФК (прежде всего H_2O_2 и иных пероксидных соединений, которые нейтрализуются в реакции излучения света).

В пользу протекторной функции грибного свечения, которое препятствует развитию инициируемых радикалами кислорода цепей окислительных реакций при оксидативном стрессе, свидетельствует также сравнительный анализ содержания начальных и конечных продуктов ПОЛ в биомассе контрольных (сразу после механического повреждения) и опытных (максимальная интенсивность свечения при инкубации) образцов мицелия *N. nambi*. Из результатов исследований экстрактов видно (рис. 4), что при высокой интенсивности све-

товой эмиссии инкубируемого мицелия в нем наблюдается значительное снижение уровня ДК, по сравнению с контрольным мицелием с невысоким начальным уровнем свечения. При этом снижение уровня ДК отмечается как в фазе гептана, так и в фазе изопропанола – в 1,4 и 3,1 раза соответственно (рис. 4). Поскольку в фазе изопропанола экстрактов из контрольных образцов мицелия было обнаружено значительно большее содержание ДК (рис. 4) по сравнению с их содержанием в фазе гептана, это позволяет говорить, что в поврежденном мицелии *N. nambi* перекисное окисление фосфолипидов идет гораздо интенсивнее, чем перекисное окисление нейтральных липидов. Такой вы-

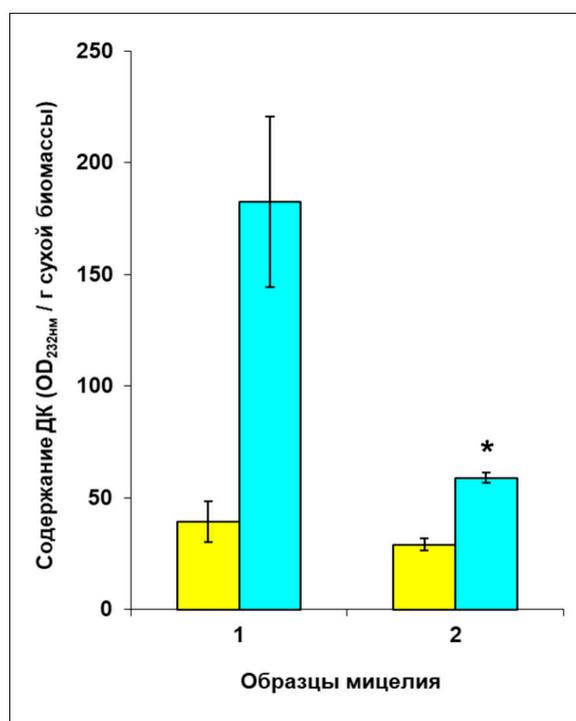


Рис. 4. Уровень содержания диеновых конъюгатов (ДК) в биомассе мицелия *N. nambi* до (1) и после (2) инкубации дисков в питательной среде в течение 4 часов. Количественную оценку ДК проводили в экстрактах из биомассы гриба смесью гептана (желтые столбцы) и изопропанола (голубые столбцы) и последующего разделения фаз

Fig. 4. The level of diene conjugates (DC) in biomass of *N. nambi* mycelium before (1) and after (2) 4-hour incubation of discs in a nutrient medium. The quantitative assessment of DC was carried out in extracts from the fungal biomass with a mixture of heptane (yellow columns) and isopropanol (blue columns) and subsequent phase separation

вод можно считать правомочным, так как он согласуется с мнением других авторов, что уровни ДК в фазах гептана и изопропанола отражают интенсивность происходящих в биологических объектах процессов перекисного окисления нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно (Placer, 1968; Хышиктуев и др., 1996). В экспериментах было показано также, что в образцах поврежденного мицелия *N. nambi* с высоким уровнем свечения при инкубации наблюдается существенное снижение содержания ОШ по сравнению с контрольными образцами (рис. 5). Из представленных данных следует, что в биомассе ярко светящегося мицелия обнаруживается практически в 3 раза меньше конечных продуктов ПОЛ. Со-

вокупность представленных данных (рис. 4 и рис. 5) позволяет говорить, что биолюминесценция базидиомицета *N. nambi* является его защитной функцией и препятствует развитию ПОЛ в условиях стресса.

Заключение

Таким образом, на примере исследований мицелия светящегося базидиомицета *N. nambi* показана взаимосвязь между уровнем световой эмиссии гриба, активностью ферментов его антиоксидантной системы и интенсивностью окислительных процессов в стрессовых условиях. Установлено, что развитие оксидативного стресса после механического повреждения грибного мицелия сопровождается значитель-

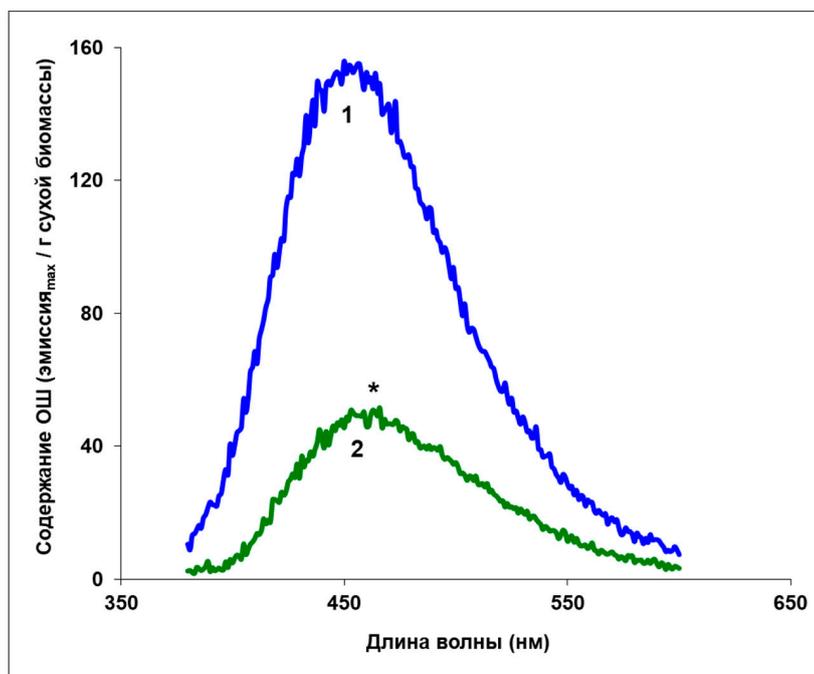


Рис. 5. Уровень интенсивности флуоресценции хлороформ-метанольных экстрактов из образцов мицелия *N. nambi*, отражающий содержание оснований Шиффа (ОШ) в биомассе гриба. Экстракция ОШ проведена из дисков мицелия до (1) и после (2) их инкубации 4 часа в питательной среде. Представлены средние значения уровней флуоресценции из 4-х независимых определений

Fig. 5. The level of fluorescence intensity of chloroform- methanol extracts from *N. nambi* mycelium samples, reflecting the content of Schiff bases (SBs) in biomass of the fungus. Extraction of SBs was carried out from mycelium disks before (1) and after (2) their 4-hour incubation in a nutrient medium. The average values of the fluorescence levels from 4 independent determinations are presented

ным (на порядки) увеличением интенсивности его свечения. Показано, что при максимальном уровне световой эмиссии в грибе регистрируется снижение активности ферментов, участвующих в метаболизме АФК – в значительной степени пероксидаз и СОД, в меньшей степени каталазы. С одной стороны, это свидетельствует о том, что на начальном этапе развития стресса защитная функция классической антиоксидантной системы гриба может быть недостаточно эффективной. В то же время значительное увеличение уровня биолуминесценции можно рассматривать как компенсаторный механизм защиты гриба от повреждения избытком АФК (в частности, H_2O_2

и других пероксидных соединений, которые нейтрализуются в реакции светоизлучения). В свою очередь, нейтрализация избыточного пула активных радикалов кислорода, образующихся в стрессовых условиях, препятствует развитию в грибе процессов свободнорадикального окисления, в частности ПОЛ. На это указывает существенное снижение содержания первичных и конечных продуктов ПОЛ, обнаруженное в биомассе ярко светящегося мицелия. Пока недостаточно ясно, могут ли продукты ПОЛ утилизироваться в реакции свечения или вовлекаются в метаболические циклы гриба – изучение этого вопроса требует отдельного исследования.

Список литературы / References

- Хышиктеув Б. С., Хышиктеуева Н. А., Иванов В. Н. (1996) Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение. *Клиническая лабораторная диагностика*, 3: 13–15 [Khyshiktuev B. S., Khyshiktueva N. A., Ivanov V. N. (1996) Methods of measuring lipid peroxidation products in exhaled air condensate and their clinical significance. *Klinicheskaja laboratornaia diagnostika*, 3: 13–15 (in Russian)]
- Aebi H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126
- Anderson G. L., Deinard A. S. (1974) The nitroblue tetrazolium (NBT) test: a review. *American Journal of Medical Technology*, 40(8): 345–353
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399
- Barros M. P., Bechara E. J. H. (1998) Bioluminescence as a possible auxiliary oxygen detoxifying mechanism in elaterid larvae. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(5): 767–777
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Gitelson J. I. (2011) The luminescent system of the luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 438(1): 138–140
- Bondar V. S., Shimomura O., Gitelson J. I. (2012a) Luminescence of higher mushrooms. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 5(4): 331–351
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Kalacheva G. S., Gitelson J. I. (2012b) A study of *Neonothopanus nambi* luminescent system. *Luminescence*, 27: 101–102
- Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Tyulkova N. A., Tyaglik A. B., Shpak B. A., Gitelson J. I. (2013) On the mechanism of luminescence of the fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 449(1): 80–83
- Bondar V. S., Puzyr A. P., Purtov K. V., Petunin A. I., Burov A. E., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Shpak B. A., Tyaglik A. B., Shimomura O., Gitelson I. I. (2014) Isolation of luminescence system from the luminescent fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 455(1): 56–58

Bondar V. S., Puzyr A. P., Burov A. E., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Kobzeva T. V., Melnikov A. R., Karogodina T. Y., Zikirin S. B., Stass D. V., Molin Yu. N., Gitelson J. I. (2015) Effect of ionizing radiation on the luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 460(1): 30–33

Desjardin D. E., Oliveira A. G., Stevani C. V. (2008) Fungi bioluminescence revisited. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7(2): 170–182

Fletcher B. L., Dillard C. J., Tappel A. L. (1973) Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Analytical Biochemistry*, 52(1): 1–9

Garcia-Iriepa C., Losantos R., Fernandez-Martinez D., Sampedro D., Navizet I. (2020) Fungal light emitter: understanding its chemical nature and pH-dependent emission in water solution. *Journal of Organic Chemistry*, 85(8): 5503–5510

Gitelson J. I., Bondar V. S., Medvedeva S. E., Rodicheva E. K., Vydryakova G. A. (2012) Chemiluminescent emission of tissues of fruit bodies of higher fungi. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 443(1): 105–108

Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Oxford Press, 936 p.

Harvey E. N. (1952) *Bioluminescence*. New York, Academic Press, 649 p.

Harvey E. N. (1957) *A history of luminescence from the earliest times until 1900*. Baltimore, Maryland, J. H. Furst Company, 768 p.

Jaspers P., Kangasjarvi J. (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, 138(4): 405–413

Johnson F. H., Haneda Y. (1966) *Bioluminescence in progress*. Princeton, Princeton University Press, 664 p.

Kaskova Z. M., Dörr F. A., Petushkov V. N., Purtov K. V., Tsarkova A. S., Rodionova N. S., Mineev K. S., Guglya E. B., Kotlobay A., Baleeva N. S., Baranov M. S., Arseniev A. S., Gitelson J. I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie Sh., Pinto E., Mascio P. D., Waldenmaier H. E., Pereira T. A., Carvalho R. P., Oliveira A. G., Oba Yu., Bastos E. L., Stevani C. V., Yampolsky I. V. (2017) Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Science Advances*, 3(4): e1602847

Katsev A. M., Wegrzyn G., Szpilewska H. (2004) Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 44(3): 178–184

Kobzeva T. V., Melnikov A. R., Karogodina T. Y., Zikirin S. B., Stass D. V., Molin Yu. N., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Puzyr A. P., Burov A. A., Bondar V. S., Gitelson J. I. (2014) Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambi* by ionizing radiation. *Luminescence*, 29(7): 703–710

Kotlobay A. A., Sarkisyan K. S., Mokrushina Y. A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E. O., Markina N. M., Somermeyer L. G., Gorokhovatsky A. Y., Vvedensky A., Purtov K. V., Petushkov V. N., Rodionova N. S., Chepurnyh T. V., Fakhranurova L. I., Guglya E. B., Ziganshin R., Tsarkova A. S., Kaskova Z. M., Shender V., Abakumov M., Abakumova T. O., Povolotskaya I. S., Eroshkin F. M., Zaisky A. G., Mishin A. S., Dolgov S. V., Mitiouchkina T. Y., Kopantzev E. P., Waldenmaier H. E., Oliveira A. G., Oba Yu., Barsova E., Bogdanova E. A., Gabaldón T., Stevani C. V., Lukyanov S., Smirnov I. V., Gitelson J. I., Kondrashov F. A., Yampolsky I. V. (2018) Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(50): 12728–12732

- McElroy W.D., Strehler B. L. (1949) Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate. *Archives of Biochemistry*, 22(3): 420–433
- McElroy W.D., Seliger H. H. (1961) Mechanisms of bioluminescent reactions. *Light and life*. McElroy W.D., Glass B. (eds.) Baltimore, Johns Hopkins Press, p. 219–257
- Medvedeva S. E., Artemenko K. S., Krivosheenko A. A., Rusinova A. G., Rodicheva E. K., Puzyr A. P., Bondar V. S. (2014) Growth and light emission of luminous basidiomycetes cultivated on solid media and in submerged culture. *Mycosphere*, 5(4): 565–577
- Mogilnaya O. A., Ronzhin N. O., Medvedeva S. E., Bondar V. S. (2015) Total peroxidase and catalase activity of luminous basidiomycetes *Armillaria borealis* and *Neonothopanus nambi* in comparison with the level of light emission. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(4): 419–424
- Mogilnaya O. A., Ronzhin N. O., Bondar V. S. (2016) Comparative evaluation of total peroxidase and catalase activities during light emission of luminous fungus *Neonothopanus nambi*. *Mycosphere*, 7(4): 499–510
- Oba Y., Suzuki Y., Martins G. N. R., Carvalho R. P., Pereira T. A., Waldenmaier H. E., Kanie S., Naito M., Oliveira A. G., Dörr F. A., Pinto E., Yampolsky I. V., Stevani C. V. (2017) Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 16(9): 1435–1440
- Peskin A. V., Winterbourn C. C. (2000) A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*, 293(1–2): 157–166
- Placer Z. (1968) Lipoperoxidation systeme im biologischen material. *Die Nahrung*, 12: 679–684
- Polesskaya O. G., Kashirina E. I., Alekhina N. D. (2004) Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(5): 615–620
- Purtov K. V., Petushkov V. N., Baranov M. S., Mineev K. S., Rodionova N. S., Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., Petunin A. I., Bondar V. S., Rodicheva E. K., Medvedeva S. E., Oba Yu., Oba Yu., Arseniev A. S., Lukyanov S., Gitelson J. I., Yampolsky I. V. (2015) The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(28): 8124–8128
- Puzyr A. P., Burov A. E., Medvedeva S. E., Burova O. G., Bondar V. S. (2019) Two forms of substrate for the bioluminescent reaction in three species of basidiomycetes. *Mycology*, 10(2): 84–91
- Shimomura O. (1992) The role of superoxide dismutase in regulating the light emission of luminescent fungi. *Journal of Experimental Botany*, 43(11): 1519–1525
- Shimomura O., Satoh S., Kishi Y. (1993) Structure and non-enzymatic light emission of two luciferin precursors isolated from the luminous mushroom *Panellus stipticus*. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 8(4): 201–205
- Shimomura O. (2006) *Bioluminescence: chemical principles and methods*. Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 470 p.
- Szpilewska H., Czyz A., Wegrzyn G. (2003) Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. *Current Microbiology*, 47(5): 379–382
- Vladimirov Yu. A. (1994) Intrinsic chemiluminescence of living tissues. *Free radicals in the environment, medicine and toxicology*. Nohl H., Esterbauer H., Rice-Evans C. (eds.) London, Richelieu Press, p. 345–373
- Vladimirov Yu. A., Proskurnina E. V. (2009) Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Moscow)*, 74(13): 1545–1566

Vladimirov Yu.A., Proskurnina E. V., Demin E. M., Matveeva N. S., Lubitskiy O. B., Novikov A. A., Izmailov D. Yu., Osipov A. N., Tikhonov V. P., Kagan V. E. (2009) Dihydroquercetin (taxifolin) and other flavonoids as inhibitors of free radical formation at key stages of apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, 74(3): 301–307

Watanabe H., Nagoshi T., Inaba H. (1993) Luminescence of a bacterial luciferase intermediate by reaction with H₂O₂: the evolutionary origin of luciferase and source of endogenous light emission. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1141(2–3): 297–302

Wi S. J., Ji N. R., Park K. Y. (2012) Synergistic biosynthesis of biphasic ethylene and reactive oxygen species in response to hemibiotrophic phytophthora parasitica in tobacco plants. *Plant Physiology*, 159(1): 251–265

Yin H., Xu L., Porter N. A. (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10): 5944–5972

DOI 10.17516/1997-1389-0392

EDN: NXFKUH

УДК 577.151:636.087: 663.18

The Influence of the Sorghum Grain Composition on the Efficiency of its Microbial Conversion to Ethanol and Lysine

Elena M. Serba^{*a},
Lyubov V. Rimareva^a, Van Chi Tran^b,
Marina B. Overchenko^a, Nadezhda I. Ignatova^a,
Anzhelika A. Pavlova^a and Irina M. Abramova^a
^a*Russian Research Institute of Food Biotechnology-
Branch of the Federal Research Center for Nutrition,
Biotechnology and Food Safety
Moscow, Russian Federation*
^b*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
Thai Nguyen, Vietnam*

Received 26.03.2021, received in revised form 16.07.2021, accepted 21.10.2021

Abstract. Sugar sorghum has been extensively studied as a promising crop for the production of alcohol instead of traditionally used food crops. However, the issues of combined biotechnological processing of grain sorghum into ethanol and protein-amino acid feed supplements have hardly been investigated. The aim of the present work was to study the effect of the polymer composition of sorghum grain on the quality of wort, the efficiency of its fermentation, the yield of alcohol, and the synthesis of lysine. Different varieties of grain sorghum, alcohol yeast *Saccharomyces cerevisiae* 985-T, and lysine producer *Brevibacterium* RCAM 01129 were used in this study. The wort prepared from sorghum grain with higher starchiness had adequate extract content and contained the maximum amount of soluble dry and reducing carbohydrates. However, the high content of non-starch polysaccharides and proteins negatively affected the rheological properties of the wort, the viscosity of which increased by 20–30 %. The level of ethanol synthesis was essentially determined by the quality parameters of the wort and the content of the main polymers in the grain. Thus, the results of fermentation of wort prepared from sorghum grain with starch content of about 72 % but differing in the content of other polymers showed that the

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: serbae@mail.ru

ORCID: 0000-0002-1660-2634 (Serba E.); 0000-0003-3097-0836 (Rimareva L.); 0000-0001-5067-6189 (Tran V.C.); 0000-0001-9297-0554 (Abramova I.)

level of alcohol formation was higher in the brews of varieties with reduced hemicellulose content. The lowest degree of conversion of carbohydrates to ethanol was observed in the fermentation of wort prepared from sorghum with hemicellulose content of 8.3 %, despite its highest starchiness (75.6 %). At the same time, the yield of alcohol from 100 g of starch was 64.3 cm³, which was 3.3–3.6 % lower than where varieties with lower content of non-starch polysaccharides were used. The level of synthesis of lysine, as well as ethanol, was influenced by the content of carbohydrate and protein polymers in the sorghum varieties studied in this work. The highest lysine yield (28.7 %) was achieved on nutrient media prepared from sorghum varieties high in starch (74.1 %) and protein (12.0 %) but low in hemicellulose (6.1 %). A scheme of combined production of alcohol and lysine-protein feed supplements has been developed, in which the protein and lysine contents are higher by a factor of 1.8 and 36.5, respectively, compared to grain vinasse.

Keywords: grain sorghum, wort, microbial conversion, ethanol, lysine.

Acknowledgements. The research was supported by the subsidy for the fulfillment of the state task within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research.

Citation: Serba E. M., Rimareva L. V., Tran V. C., Overchenko M. B., Ignatova N. I., Pavlova A. A., Abramova I. M. The influence of the sorghum grain composition on the efficiency of its microbial conversion to ethanol and lysine. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(3), 347–362. DOI: 10.17516/1997-1389-0392



Влияние особенностей состава зерна сорго на эффективность его микробной конверсии в этанол и лизин

Е. М. Серба^а, Л. В. Римарева^а,

В. Т. Чан^б, М. Б. Оверченко^а,

Н. И. Игнатова^а, А. А. Павлова^а, И. М. Абрамова^а

*^аВсероссийский научно-исследовательский институт
пищевой биотехнологии –*

*филиал Федерального исследовательского центра питания,
биотехнологии и безопасности пищи*

Российская Федерация, Москва

*^бТхайнгуенский университет сельского и лесного хозяйства
Вьетнам, Тхайнгуен*

Аннотация. Показана перспективность использования сахарного сорго в производстве спирта взамен традиционно применяемых зерновых культур пищевого назначения. Однако практически не исследованы вопросы комплексной биотехнологической переработки зернового сорго в этанол и кормовые белково-аминокислотные добавки. Цель работы состояла в изучении влияния

особенностей состава полимеров зерна сорго на качество суслу, эффективность его сбраживания, выход спирта и синтез лизина. Объектами исследований являлись различные сорта зернового сорго, спиртовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 985-Г и продуцент лизина *Brevibacterium* RCAM 01129. Сусло, приготовленное из зерна сорго с более высокой крахмалистостью, обладало хорошей экстрактивностью и содержало максимальное количество растворимых сухих и редуцирующих углеводов. Однако высокое содержание некрахмальных полисахаридов и белков отрицательно сказывалось на реологических свойствах суслу, вязкость которого повышалась на 20–30 %. Уровень синтеза этанола существенно зависел от качественных показателей суслу и от содержания в зерне основных полимеров. Так, результаты сбраживания суслу, приготовленного из зерна сорго с крахмалистостью порядка 72 %, но различающегося по содержанию других полимеров, показали, что более высокий уровень образования спирта отмечен в бражке из сортов с пониженным содержанием гемицеллюлозы. Наиболее низкая степень конверсии углеводов в этанол отмечена при сбраживании суслу, приготовленного из сорта сорго с содержанием гемицеллюлозы 8,3 %, несмотря на самую высокую его крахмалистость (75,6 %). При этом выход спирта со 100 г крахмала составил 64,3 см³, что на 3,3–3,6 % ниже аналогичных показателей в вариантах, где использовались сорта с более низким содержанием некрахмальных полисахаридов. На уровень синтеза лизина, так же как этанола, оказывало влияние содержание углеводных и белковых полимеров в исследуемых сортах сорго. Наибольший выход лизина (28,7 %) достигнут на питательных средах, приготовленных из сортов сорго с высоким содержанием крахмала (74,1 %) и белка (12,0 %), но пониженным – гемицеллюлоз (6,1 %). Представлена схема комплексного производства спирта и кормовой лизино-белковой добавки, в которой содержание белка в 1,8 раза, а лизина – в 36,5 раза выше, чем в зерновой барде.

Ключевые слова: зерновое сорго, сусло, микробная конверсия, этанол, лизин

Благодарности. Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований.

Цитирование: Серба, Е. М. Влияние особенностей состава зерна сорго на эффективность его микробной конверсии в этанол и лизин / Е. М. Серба, Л. В. Римарева, В. Т. Чан, М. Б. Оверченко, Н. И. Игнатова, А. А. Павлова, И. М. Абрамова // Журн. Сиб. федер. ун- та. Биология, 2022. 15(3). С. 347–362. DOI: 10.17516/1997-1389-0392

Введение

Проблема рационального использования сырьевых ресурсов в перерабатывающих отраслях агропромышленного комплекса является весьма актуальной. Особенно это относится к спиртовому производству, которое в настоящее время методами биотехнологии ежегодно перерабатывает порядка 2 млн т зерна пшеницы, кукурузы и ржи, имеющих широкую востребованность в пищевой промышленности

(Серба, Поляков, 2015). При условии реализации в России промышленной технологии топливного биоэтанола потребность в зерновом сырье резко возрастет. Поэтому исследования, направленные на подбор нетрадиционных видов растительного сырья и разработку эффективных методов их переработки на спирт, становятся сегодня наиболее перспективными.

В последнее время внимание исследователей привлекает зерновая культура сахарного

сорго – *Sorghum bicolor* (L.) Moench, которая отличается хорошей устойчивостью к условиям выращивания и обладает достаточно высокой продуктивностью, а по содержанию крахмала конкурирует с зерновыми культурами (Володько и др., 2012; Гаршин и др., 2014; Григоренко, 2016; Алабушев и др., 2016а; Ковтунова и др., 2017). Зерно сахарного сорго является не только источником углеводов, но и содержит белок, витамины и минеральные вещества. По содержанию ряда витаминов (В₃, В₄, В₅), макро- (Са, Р, Mg, Se) и микроэлементов (Fe, Zn, Cu, Mn) превосходит зерно кукурузы (Николаев и др., 2018).

Результаты сравнительных исследований биохимического состава наиболее продуктивных по крахмалу зерновых культур по усредненным данным ряда авторов приведены в табл. 1 (Алабушев и др., 2016а; 2016б; Ковтунова и др., 2017; Николаев и др., 2018; Карл Хосни, 2006; Зверев, Зверева, 2007; Новикова и др., 2007; Sanjana Reddy et al., 2011; Абрамова и др., 2019; Ковтунова, Ковтунов, 2019). Как видно из представленных данных, состав основных компонентов зерна сорго сравним с зерном кукурузы и риса; при этом по содержанию белка и крахмала – даже несколько превосходит. В состав зерна сорго входят также некрахмальные полисахариды, при этом отмечено достаточно высокое содержание арабиноксиланов (пентозанов).

Крахмал сорго, как и у других зерновых культур, состоит из амилозы и амилопектина и хорошо подвергается биокаталитической декстринизации и осахариванию. Соотношение амилозы и амилопектина в крахмале сорго, по данным исследователей, составляет порядка 25–30 % против 70–75 % соответственно и зависит от сорта сорго и условий произрастания культуры (Гаршин и др., 2014; Николаев и др., 2018; Алабушев и др., 2013). В настоящее время существует довольно большое количество сортов и гибридов зернового сорго, различающихся по уровню содержания основных углеводных и белковых компонентов (Алабушев и др., 2013; 2016б; Bahadure et al., 2014).

Результаты последних исследований подтвердили перспективность использования сорго зернового в качестве полноценного сырья для производства спирта, пива, крахмала и кормов (Nahar, 2011; Alhajturki et al., 2012; Kruger et al., 2012; Oyier et al., 2017). В то же время мало изучена взаимосвязь состава основных полимеров зерна с выходом и качеством целевых продуктов.

Известно, что определяющее значение для организации производства кормов, обогащенных незаменимыми аминокислотами, имеют вопросы рационального использования сырья и вторичных ресурсов агропромышленного комплекса. Особенно необходимы ресурсосбе-

Таблица 1. Сравнительный биохимический состав зерна кукурузы, риса, сорго

Table 1. Comparative biochemical composition of corn, rice, and sorghum grains

Показатель	Концентрация, % сух. веса		
	Кукуруза	Рис	Сорго
Крахмал	61,0 -71,0	62,0-72,0	61,0-76,0
Белок	9,0-10,5	7,5-9,0	10,2-14,0
Клетчатка	3,2 – 4,0	2,9 - 6,7	2,2- 3,8
Гемицеллюлоза	2,4 -3,2	2,0-4,5	4,0-9,5
Арабиноксиланы	5,9 – 6,2	1,8 – 2,2	3,8 – 8,5
Липиды	4,1 - 5,2	3,1	2,1-4,3
Зольность	1,3 -2,1	2,3	1,6 -2,6

регающие технологии для производства спирта, в котором наряду с основным продуктом образуется существенный объем отходов в виде послеспиртовой барды (Серба, Поляков, 2015; Иванов и др., 2015; Зуева и др., 2019; Кривченко и др., 2019). В последнее время твердую фазу барды после разделения сушат и используют для кормления сельскохозяйственных животных. Однако остается проблема реализации большого объема жидкой фазы (Амелякина и др., 2012). Для повышения биологической ценности барду можно обогатить лизином, используя ее в качестве субстрата в составе питательной среды для лизинпродуцирующих бактерий. Проведенные ранее исследования показали принципиальную возможность получения кормового лизина при культивировании *Brevibacterium* sp. на питательных средах, содержащих крахмалсодержащее сырье, продукты и отходы бродительных производств (Серба, Поляков, 2015; Римарева и др., 2008; Римарева, Григорьев, 2009). Однако исследований по влиянию состава полимеров, содержащихся в зерне различных сортов зерновых культур, в том числе и сорго, используемых для приготовления сусла, на выход спирта и уровень синтеза лизина практически не проводилось.

Цель данных исследований состояла в изучении влияния особенностей состава полимеров в зерне различных сортов сорго на качество сусла, эффективность его сбраживания, выход спирта и синтез лизина.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись различные сорта зернового сорго, предоставленные ВНИИ сорго и других зерновых культур (г. Зерноград), различающиеся по содержанию белковых и углеводных полимеров; спиртовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* расы 985-Т (Серба и др., 2019) и продуцент лизина *Brevibacterium* RCAM 01129, селекциониро-

ванные во ВНИИ пищевой биотехнологии (Римарева и др., 2008).

Зерно сорго измельчали до размера частиц 40–120 мкм при помощи мультифункциональной дробилки Вилитек VLM-6, Россия. Приготовление зернового сусла проводили по схеме ферментативно-гидролитической обработки зерна в колбах Эрленмейера объемом 750 см³, содержащих 50 г измельченного зерна и 150 см³ воды (гидромодуль 1:3), помещенных в водяную баню ПЭ-4300 («Экрос», Россия). В водно-зерновую суспензию добавляли термостабильную α -амилазу, катализирующую разжижение и декстринизацию крахмала, в дозировке 0,5 ед. АС/г крахмала и выдерживали при температуре 40–60 °С в течение 30 мин. Поскольку температура клейстеризации крахмала сорго составляет 70–80 °С, дальнейшее приготовление замеса осуществляли при температуре 85–90 °С в течение 120 мин, периодически перемешивая. Далее содержимое колб охлаждали до 60 °С и инкубировали в присутствии ферментов в течение 60 мин (Иванов и др., 2015; Зуева и др., 2019; Кривченко и др., 2019). Для получения зернового сусла осахаривание крахмала и гидролиз некрахмальных полисахаридов, в том числе арабиноксиланов, осуществляли ферментными препаратами (ФП) – источниками глюкоамилазы (9,0 ед. ГлС/г крахмала) и ксиланазы (0,15 ед. КС/г сырья), для гидролиза белковых веществ использовали ФП, содержащий комплекс грибных протеаз (0,1 ед. ПС/г сырья).

В работе использовали традиционные для спиртового производства ферментные препараты с различной субстратной специфичностью: Amylex 5T («Genencor», США) – источник термостабильной α -амилазы (2000 ед. АС/см³), Diazyme X5 («Genencor», США) – глюкоамилазы (8000 ед. ГлС/см³), Tegazyme RT 75L («Lyven SA», Франция) – ксиланазы (3600 ед. КС/см³), Протооризин («ВНИИПБТ», Россия) – протеазы (600 ед. ПС/см³).

Массовую долю растворимых сухих веществ определяли на рефрактометре УРЛ модель-1. Содержание в сухом веществе крахмала анализировали по методу Эверса, белка (сырого протеина) – по методу Къельдаля на автоматической установке определения азота Vadopest 10 (Gerhardt, Германия) с использованием автоматического титратора DL 15 (Mettler Toledo, Швейцария); содержание аминокислот – на хроматографе KNAUER EUROCHROM 2000 с последующим детектированием компонентов спектрофотометрическим детектором Smartline UV Detector 2500 (Германия) при $\lambda=570$ нм; концентрацию редуцирующих веществ (РВ) тестировали методом Антрона; концентрацию аминного азота (NH_2^+) – медным способом (ОФС.1.2.3.0022.15; Поляков и др., 2007). Динамическую вязкость зернового суслу оценивали методом вибрационной вискозиметрии с использованием синусоидального вибрационного вискозиметра SV-10 (A&D, Япония) с программным обеспечением Win-CT Viscosity.

Процесс сбраживания суслу, приготовленного из зерна сорго, осуществляли с использованием селекционированной расы дрожжей *S. cerevisiae* 985-Т, обладающей термотолерантными и осмофильными свойствами, при температуре 34–35 °С в течение 68 часов (Серба и др., 2019). Концентрацию суслу, дрожжей, остаточных углеводов, спирта и его выход контролировали согласно инструкции технохимического контроля спиртового производства (Поляков и др., 2007).

Культивирование *Brevibacterium* RCAM 01129 осуществляли на питательных средах, приготовленных на отъеме суслу из различных сортов сорго и послеспиртовой барды в соотношении 1:1. Стерилизацию питательной среды проводили в автоклаве при 0,8 атм (0,081 МПа) в течение 40 мин. Засев стерильной среды осуществляли посевным материа-

лом в виде суспензии бактерий в количестве 4 % (об./об.). Культивирование *Brevibacterium* проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 см³, содержащих 25 см³ питательной среды, на круговой качалке (скорость вращения 220–240 об/мин) в течение 48 часов при температуре 30 °С. Содержание лизина определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV 254 высотой 15 см (Римарева и др., 2010).

Статистическую обработку данных, полученных не менее чем в 3 повторностях, осуществляли с помощью программы Microsoft Excel с использованием коэффициента Стьюдента (доверительный интервал – 0,95).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе из исследованных сортов зернового сорго было отобрано семь с более высоким содержанием крахмала: 68,7–75,6 % при влажности зерна не более 14 %. Именно это качество дает культуре зернового сорго преимущество в использовании не только как сырья для производства этилового спирта, но и как источника углеводов для микробной конверсии их в лизин.

Отобранные сорта сорго по количеству крахмала в зерне превосходили традиционно применяемые в спиртовом производстве зерновые культуры, такие как пшеница, рожь и кукуруза (Абрамова и др., 2019), и различались по уровню содержания белка и гемицеллюлозы (рис. 1).

Из исследованных сортов сорго наибольшей крахмалистостью обладали два сорта III и V, уровень крахмала в которых соответствовал 74,1 и 75,6 %, белка – 12,0 и 10,4 %, гемицеллюлоз – 6,1 и 8,3 % соответственно. Наиболее высокое содержание белка отмечено в сорте II (13,7 %) и сорте IV (12,5 %), в которых крахмалистость составила менее 70 % (рис. 1).

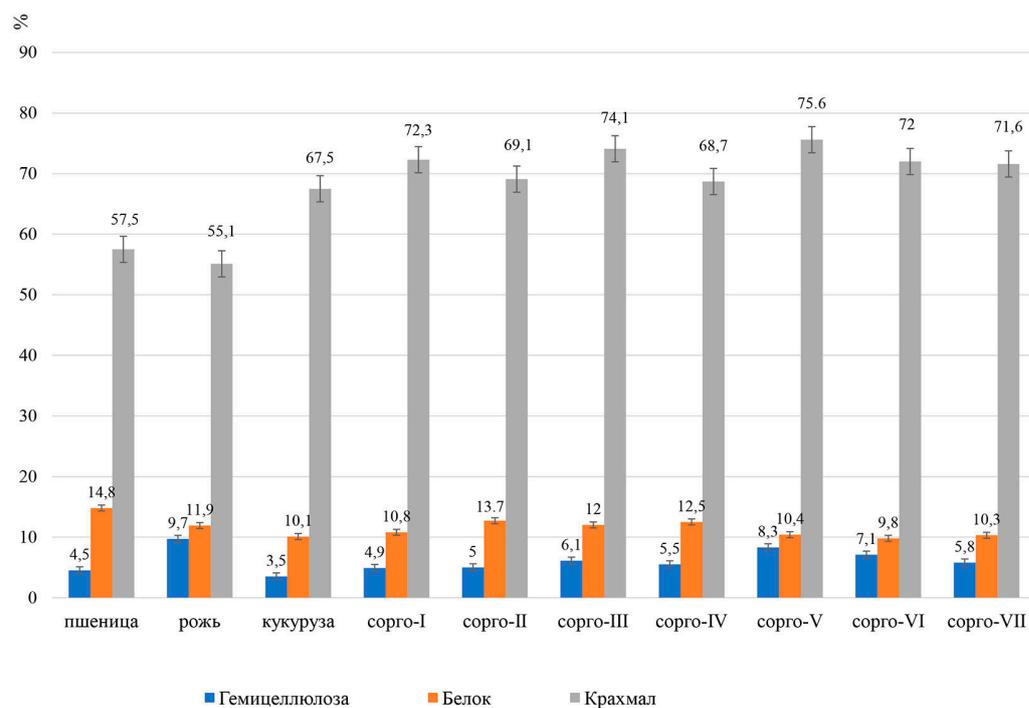


Рис. 1. Содержание (% сух. веса) крахмала, гемицеллюлозы и белка в исследованных сортах сорго в сравнении с зерном пшеницы, кукурузы и ржи

Fig. 1. The content (% d.w.) of starch, hemicellulose, and protein in the sorghum varieties compared with wheat, corn, and rye grains

Результаты исследований аминокислотного состава белка зернового сорго показали, что сорт культуры не оказывал на него существенного влияния. Биологическая ценность белков сорго подтверждалась присутствием всех незаменимых аминокислот (табл. 2). В табл. 2 представлены результаты исследований, проведенных с сортом сорго-II с более высоким содержанием белка. Практически аналогичные данные были получены при исследовании аминокислотного состава других сортов сорго. Для сравнения выбрана кукуруза как культура с наиболее высоким содержанием крахмала из традиционно применяемых в спиртовом производстве. Количественное содержание аминокислот в сорго незначительно отличалось от аминокислотного состава кукурузы, но немного превосходило по содержанию

лизина и лейцина и уступало по количеству метионина.

Результаты сравнительных исследований технологических свойств зерна ряда сортов сорго как сырья для приготовления суслу в производстве спирта позволили отобрать наиболее перспективные из них (рис. 1, табл. 3). При этом установлено, что уровень содержания в зерне основных полимеров оказывал определенное влияние на качественные характеристики суслу.

Суслу из сорго готовили с соблюдением стандартных условий ферментативно-гидролитической обработки зерна (Серба и др., 2018). Для полноты осахаривания крахмала и улучшения реологических свойств суслу использовали ФП – источники глюкоамилазы и ксиланазы; для деструкции белковых веществ в усвояемые дрожжами ами-

Таблица 2. Аминокислотный состав белков зерна кукурузы и сорго (сорт II)

Table 2. Amino acid composition of corn and sorghum (variety II) grain proteins

Аминокислоты	Количественное содержание, %	
	Кукуруза	Сорго
Лизин	2,00±0,10	2,60±0,10
Метионин	2,50±0,08	1,92±0,06
Триптофан	0,60±0,02	0,94±0,03
Валин	4,72±0,30	5,12±0,26
Изолейцин	3,84±0,15	4,02±0,16
Лейцин	13,20±0,45	13,75±0,50
Треонин	3,50±0,15	3,76±0,12
Фенилаланин	5,12±0,25	5,05±0,24
Гистидин	2,84±0,13	2,34±0,12
Аргинин	3,82±0,15	4,16±0,17
Аспарагиновая кислота	6,23±0,30	6,42±0,32
Глютаминовая кислота	21,00±0,80	19,85±0,75
Серин	4,74±0,20	4,24±0,18
Пролин	8,72±0,42	7,73±0,35
Глицин	3,24±0,14	3,36±0,14
Аланин	8,16±0,35	8,71±0,36
Цистин	1,82±0,08	1,32±0,06
Тирозин	4,34±0,16	5,34±0,20

Таблица 3. Влияние сортов зернового сорго на качество сусла и спиртовое брожение

Table 3. Influence of grain sorghum varieties on wort quality and alcoholic fermentation

Сорт сорго	Характеристика сусла				Характеристика бражки		
	PCB, %	Вязкость, мПа·с	PB, г/100 см ³	Аминный азот, мг%	PB, г/100 см ³	Концентрация спирта, % об	Выход спирта, см ³ /100 г крахмала
I	24,1±1,2	20,1±1,0	19,2±0,9	25,2±1,3	0,27±0,01	12,05±0,50	66,7±2,1
II	22,9±1,1	20,4±1,1	18,2±0,7	26,2±1,4	0,28±0,01	11,70±0,42	66,6±2,0
III	24,5±1,3	23,7±1,4	19,6±1,0	25,9±1,2	0,30±0,02	12,30±0,55	66,5±2,0
IV	22,6±1,0	21,6±1,2	18,7±0,7	26,1±1,4	0,28±0,01	11,42±0,38	66,5±1,9
V	24,4±1,4	29,1±1,5	19,5±1,0	24,8±1,2	0,49±0,03	12,12±0,55	64,3±1,4
VI	24,0±1,2	26,8±1,4	19,1±0,9	24,6±1,2	0,37±0,02	11,75±0,42	65,3±1,6
VII	24,1±1,2	22,9±1,2	19,2±1,0	25,1±1,3	0,30±0,02	11,92±0,46	66,5±2,0

Примечание: PB – редуцирующие вещества, PCB – растворимые сухие вещества

нокислоты вводили ФП – источник кислой протеиназы и пептидазы. Концентрация растворимых сухих веществ (PCB) сусла составила 22,6–24,5 % в зависимости от использованного сорта сорго.

Сусло из сортов сорго с более высокой крахмалистостью обладало хорошей экстрактивностью и содержало максимальное

количество PCB и PB (табл. 3). В сусле, приготовленном из сортов сорго II и IV, характеризовавшихся высоким содержанием белка, отмечена более высокая концентрация аминного азота (свыше 26,0 мг%). Наиболее высокой вязкостью отличалось сусло, приготовленное из сортов сорго с повышенным содержанием гемицеллюлоз: 29,1 мПа·с (сорт V)

и 26,8 мПа·с (сорт VI), что на 20–30 % превосходило аналогичные показатели суслу из других сортов.

Результаты исследований процесса сбраживания суслу, приготовленного из испытанных сортов сорго, подтвердили, что количество крахмала в зерне – основного источника сбраживаемых углеводов, является важным показателем, обеспечивающим синтез этанола. Однако присутствие в зерне некрахмальных полисахаридов и белка, способных образовывать достаточно прочные комплексы, оказывает корректирующее влияние на выход целевого продукта. Это, по-видимому, связано со снижением доступа амилолитических ферментов к крахмалу и понижением степени его конверсии, а также с ухудшением реологических свойств суслу, что подтверждается результатами ряда исследований и полученными экспериментальными данными (Родионова и др., 1992; Guillaume et al., 2019; Римарева и др., 2017). Так, сравнительные результаты эффективности сбраживания суслу,

приготовленного из зерна сорго (I, VI и VII) с практически одинаковой крахмалистостью (порядка 72 %), но различающегося по содержанию гемицеллюлозы, показали, что более высокий уровень образования спирта отмечен в бражке из сортов (I и VII) с пониженным содержанием некрахмальных полисахаридов (табл. 3, рис. 2). Наиболее низкая степень конверсии углеводов в этанол отмечена при сбраживании суслу, приготовленного из сорта V с самым высоким содержанием крахмала (75,6 %) и гемицеллюлоз (8,3 %), при этом выход спирта со 100 г крахмала составил 64,3 см³, что на 3,3–3,6 % ниже аналогичных показателей в вариантах, где использовались сорта как с более низким содержанием крахмала, так и гемицеллюлоз.

Таким образом, показано, что на эффективность сбраживания зернового суслу, приготовленного из различных сортов сорго, существенное влияние оказывает не только крахмалистость зерна, но и содержание некрахмальных полисахаридов, негативно

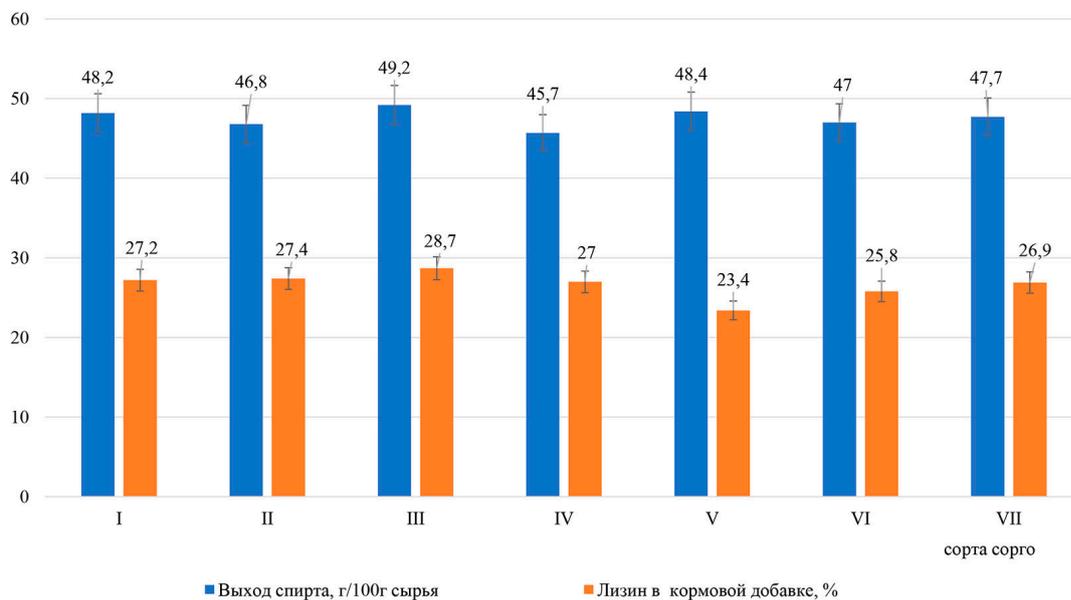


Рис. 2. Зависимость выхода спирта (г/100 г сырья) и лизина (% сух. веса) от сорта сорго

Fig. 2. Dependence of alcohol (g/100 g raw material) and lysine (% d.w.) yields on sorghum variety

сказывающееся на реологических свойствах суслу. В связи с этим сорта сорго с более высоким содержанием крахмала и низким – гемицеллюлоз предпочтительно использовать в производстве этанола.

На следующем этапе работ подтверждена возможность комплексной ресурсосберегающей переработки зернового сорго в этанол и содержащую лизин кормовую добавку. Как следует из выше приведенных данных, исследованные сорта сорго по содержанию крахмала превосходили другие зерновые культуры (рис. 1). Кроме того, наличие в зерне помимо крахмала белковых веществ, незаменимых аминокислот позволило обогатить среду легкоусвояемым аминным азотом, что особенно важно для синтеза лизина (табл. 2 и 3).

Используемый в работе продуцент лизина *Brevibacterium* RCAM 01129, как и многие другие промышленные штаммы, является ауксотрофным, имеющим потребность в присутствии в среде аминокислот (треонина, метионина, предшественником которых является гомосерин), витаминов и микроэлементов (Римарева, Григорьев, 2009; Андрияш и др., 2012, 2014). Штамм синтезирует внутриклеточные пептидазы и способен эффективно усваивать короткие пептиды, но не образует внеклеточных протеаз и не ассимилирует белки и высокомолекулярные пептиды из питательной среды. Поэтому применение зернового сорго, содержащего помимо полисахаридов другие ценные компоненты (белки, витамины и микроэлементы), позволило повысить эффективность биоконверсии углеводов в лизин. Для приготовления питательной среды использовали отъемы суслу и барды, содержащие растворимые углеводы и аминный азот, ассимилируемые продуцентом лизина.

Результаты исследований подтвердили эффективность использования комплекса

грибных протеаз для гидролиза белков зерна при приготовлении суслу. Проведение протеолиза способствовало накоплению в питательной среде свободных аминокислот, что восполнило потребность продуцента в ростовых веществах. Кроме того, в связи с тем, что зерновое суслу имело довольно вязкую консистенцию, что затрудняло доступ кислорода к клеткам бактерий, введение в качестве ингредиента питательной среды спиртовой барды позволило улучшить условия аэрации бактерий без существенной потери питательной ценности среды.

Как видно из приведенных данных, на уровень синтеза лизина, так же как этанола, оказывало влияние содержание углеводов и белковых полимеров в исследуемых сортах сорго (рис. 2). Наибольший выход лизина (28,7 %) достигнут на питательных средах, приготовленных из сортов сорго с высоким содержанием крахмала (74,1 %) и белка (12,0 %), но пониженным – гемицеллюлоз (6,1 %).

Таким образом, установлено, что количество крахмала в сырье ещё не является гарантом более высокого выхода спирта. Сорта сорго, которые характеризовались самым высоким содержанием крахмала в зерне, не были в числе лидеров по выходу спирта и лизина. Как показали исследования, синтез целевых продуктов напрямую связан с характеристикой составных ингредиентов зерна: крахмала, белка, некрахмальных полисахаридов. Последние и являются негативным фактором в отношении синтеза этанола и лизина. Следовательно, высокий выход спирта и лизина можно гарантировать как за счет увеличения количества крахмала в зерне, так и в результате снижения содержания гемицеллюлоз (рис. 2).

Проведенные исследования показали возможность создания комплексного ресур-

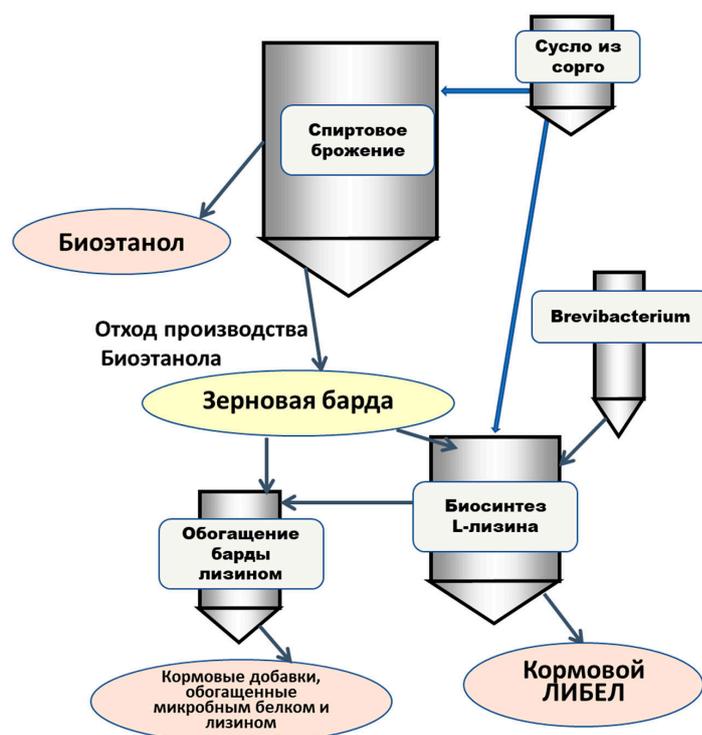


Рис. 3. Схема комплексной переработки зернового сорго на спирт и кормовые продукты

Fig. 3. A scheme of combined processing of grain sorghum to alcohol and feed products

Таблица 4. Сравнительная характеристика кормовых продуктов, полученных на основе комплексной конверсии зернового сорго на спирт и кормовые продукты

Table 4. Comparative characteristics of feeds produced using combined conversion of grain sorghum to alcohol and feed products

Продукт	Сырой протеин, % сух. веса	Истинный белок, % сух. веса	Лизин, % сух. веса
Зерновая барда	24,5±1,2	17,9±0,8	0,75±0,03
Лизино-белковый препарат	43,9±2,4	26,7±1,4	27,40±1,40

собоерегающего производства спирта и кормовой лизино-белковой добавки «Либел» на основе микробной конверсии зернового сорго (рис. 3).

Ввиду идентичности исходного сырья и части технологической схемы производства спирта, а также для обеспечения максимального использования сырья и промежуточных продуктов переработки предполагается в технологическую схему производства спир-

та ввести линию по получению кормового лизина.

В результате микробной конверсии полупродуктов и отходов спиртового производства получен кормовой продукт, в котором содержание белка было в 1,8 раза, а лизина – в 36,5 раза выше, чем в составе сухой барды (табл. 4).

Кроме того, по комплексной технологии переработки зернового сорго на спирт

можно получать дополнительные продукты, такие как кормовой лизино-белковый препарат и зерновая барда, обогащенная лизином (рис. 3).

Заключение

В результате исследований подтверждена перспективность использования зернового сорго не только как сырья для производства этилового спирта, но и как источника углеводов для микробной конверсии их в лизин. Показано, что отобранные сорта сорго по количеству крахмала в зерне превосходили пшеницу, рожь и кукурузу и различались по уровню содержания белка и гемицеллюлозы. Соотношение полимеров в составе зерна исследованных сортов сорго оказало влияние на качество и реологические свойства сусла.

Результаты исследований показали возможность комплексной биотехнологической переработки зерна сорго в этанол и кормо-

вую лизино-белковую добавку на основе конверсии полупродуктов и отходов спиртового производства. Установлено, что присутствие в зерне некрахмальных полисахаридов и белка, определяющих повышенную вязкость сусла, оказывало корректирующее влияние на выход целевых продуктов. В результате сбраживания сусла, приготовленного из сортов зернового сорго с практически одинаковой крахмалистостью, и микробной конверсии барды более высокий уровень образования этанола и лизина отмечен при использовании сортов с пониженным содержанием гемицеллюлозы.

При создании новых сортов сорго для бродильного производства необходимо выделять высокопродуктивные по крахмалу генотипы с пониженным содержанием некрахмальных полисахаридов, что обеспечит более высокий выход спирта и эффективную конверсию углеводов в лизин.

Список литературы / References

Абрамова И. М., Римарева Л. В., Туршатов М. А. (2019) *Исходные требования к качеству зернового сырья, обеспечивающие высокие показатели эффективности производства спирта*. М., Библиоглобус, 114 с. [Abramova I. M., Rimareva L. V., Turshatov M. A. (2019) *Initial requirements for the quality of grain raw materials that ensure high performance indicators of alcohol production*. Moscow, Biblioglobus, 114 p. (in Russian)]

Алабушев А. В., Ковтунов В. В., Ковтунова Н. А. (2013) *Качество зерна коллекционных образцов сорго зернового*. Ростов-на-Дону, ЗАО Книга, 144 с. [Alabushev A. V., Kovtunov V. V., Kovtunova N. A. (2013) *Grain quality of collection samples of grain sorghum*. Rostov-on-Don, CJSC Kniga, 144 p. (in Russian)]

Алабушев А. В., Ковтунов В. В., Лущина О. А. (2016а) Сорго зерновое – перспективное сырьё для производства крахмала. *Достижения науки и техники АПК*, 30(7): 64–66 [Alabushev A. V., Kovtunov V. V., Lushpina O. A. (2016a) Grain sorghum as promising raw material for starch production. *Achievements of Science and Technology of AIC* [Dostizheniya nauki i tekhniki APK], 30(7): 64–66 (in Russian)]

Алабушев А. В., Ковтунов В. В., Ковтунова Н. А., Горпиниченко С. И. (2016b) Семеноводство сорго зернового в Ростовской области. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*, 1: 12–15 [Alabushev A. V., Kovtunov V. V., Kovtunova N. A., Gorpichenko S. I. (2016b) Breeding of grain sorghum in the Rostov region. *Agricultural Science Euro-North-East* [Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka], 1: 12–15 (in Russian)]

Амелякина М. В., Римарева Л. В., Степанов В. И., Иванов В. В. (2012) Влияние протеолитических ферментов на эффективность разделения зернового суслу на твердую и жидкую фракции в комплексной технологии спиртового производства. *Производство спирта и ликероводочных изделий*, 2: 27–29 [Ameliakina M. V., Rimareva L. V., Stepanov V. I., Ivanov V. V. (2012) Influence of proteolytic enzymes on the efficiency of the separation of the grain mash into solid and liquid fractions in the complex technology of manufacture of alcohol. *Production of Alcohol and Alcoholic Beverages* [Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdelii], 2: 27–29 (in Russian)]

Андрияш Г. С., Заболотная Г. М., Шульга С. М. (2012) Ауксотрофность продуцентов лизина. *Биотехнология*, 5(1): 70–77 [Andriyash G. S., Zabolotna G. M., Shulga S. M. (2012) Auxotrophy of producers of lysin. *Biotechnology* [Biotekhnologiya], 5(1): 70–77 (in Ukrainian)]

Андрияш Г. С., Заболотная Г. М., Шульга С. М. (2014) Мутантные штаммы микроорганизмов – продуцентов лизина и треонина. *Biotechnologia Acta*, 7(3): 95–101 [Andriyash G. S., Zabolotna G. M., Shulga S. M. (2014) The mutant strains of microorganisms – producers of lysine and threonine. *Biotechnologia Acta*, 7(3): 95–101 (in Ukrainian)]

Володько А. И., Новак А. Г., Цыганков С. П. (2012) Сахарное сорго – энергетическая культура для производства биоэтанола в Украине. *Відновлююча енергетика*, 2: 88–93 [Volodko A. I., Novak A. G., Tsygankov S. P. (2012) Sugar sorghum – energy culture for bioethanol production in Ukraine. *Renewable Energy* [Vidnovlyunova energetika], 2: 88–93 (in Russian)]

Гаршин А. Ю., Жужукин В. И., Семин Д. С. (2014) Определение комбинационной способности сортообразцов сахарного сорго по качеству зерна в тестерных скрещиваниях. *Кукуруза и сорго*, 1: 20–23 [Garshin A. Yu., Zhuzhukin V. I., Semin D. S. (2014) Determination of combining ability of sweet sorghum accessions quality grain testernyh crossbreeding. *Corn and Sorghum* [Kukuruza i sorgo], 1: 20–23 (in Russian)]

Григоренко Н. О. (2016) Сорго сахарное и перспективное направление его использования. *Вестник пищевой промышленности «Сахарная отрасль»*, 5: 5–7 [Grigorenko N. O. (2016) Sugar sorghum and a promising direction of its use. *Bulletin of the Food Industry “Sugar Industry”* [Vestnik pishchevoi promyshlennosti «Sakharnaya otrasl'»], 5: 5–7 (in Russian)]

Зверев С. В., Зверева Н. С. (2007) *Физические свойства зерна и продуктов его переработки*. М., ДеЛи принт, 176 с. [Zverev S. V., Zvereva N. S. (2007) *Physical properties of grain and products of its processing*. Moscow, DeLi Print, 176 p. (in Russian)]

Зуева Н. В., Агафонов Г. В., Корчагина М. В., Долгов А. Н., Чусова А. Е. (2019) Выбор ферментных препаратов и температурно-временных режимов водно-тепловой и ферментативной обработки при разработке комплексной технологии переработки зернового сырья. *Вестник ВГУ-ИТ*, 81(1): 112–119 [Zueva N. V., Agafonov G. V., Korchagina M. V., Dolgov A. N., Chusova A. E. (2019) Selection of enzyme preparations and temperature-time regimes of water-heat and enzymatic treatment in the development of complex technology of processing of grain raw materials. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies* [Vestnik VGUIT], 81(1): 112–119 (in Russian)]

Иванов С. В., Шиян П. Л., Мудрак Т. Е., Ковальчук С. С. (2015) Ресурсосберегающие технологии подготовки крахмалсодержащего сырья к сбраживанию. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 1: 24–28 [Ivanov S. V., Shiyan P. L., Mudrak T. Y., Koval'chuk S. S. (2015) Saving technologies to prepare raw starch digestion. *Storage and Processing of Farm Products* [Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya], 1: 24–28 (in Russian)]

Карл Хосни Р. (2006) *Зерно и зернопродукты*. С.-Петербург, Профессия, 336 с. [Karl Hosni R. (2006) *Grain and grain products*. St. Petersburg, Professiya, 336 p. (in Russian)]

Ковтунова Н. А., Ерешко А. С., Ржевская А. А. (2017) Итоги испытания новых сортов и гибридов сахарного сорго. *Научное обозрение. Международный научно-практический журнал*, 2: 4–7 [Kovtunova N., Ereshko A., Rzhetskaya A. (2017) The test results of sugar sorghum new varieties and hybrids. *Scientific Review. International Scientific and Practical Journal* [Nauchnoe obozrenie. Mezhdunarodnyi nauchno-prakticheskii zhurnal], 2: 4–7 (in Russian)]

Ковтунова Н. А., Ковтунов В. В. (2019) Использование сорго сахарного в качестве источника питательных веществ для человека (обзор литературы). *Зерновое хозяйство России*, 3: 3–9 [Kovtunova N. A., Kovtunov V. V. (2019) The use of sweet sorghum as a source of nutritious substances for human (literature review). *Grain Economy of Russia* [Zernovoe khozyaistvo Rossii], 3: 3–9 (in Russian)]

Кривченко В. А., Туршатов М. В., Соловьев А. О., Абрамова И. М. (2019) Спиртовое производство – технологическая основа комплексной переработки зерна с получением пищевых продуктов. *Пищевая промышленность*, 4: 53–54 [Krivchenko V. A., Turshatov M. V., Solovyev A. O., Abramova I. M. (2019) Ethanol production is a technological basis of grain complex processing with foodstuff producing. *Food Industry* [Pishchevaya promyshlennost'], 4: 53–54 (in Russian)]

Николаев С. И., Карапетян А. К., Плешакова И. Г., Струк А. Н., Струк М. В. (2018) Сравнительный химический состав и питательность зерна кукурузы и сорго. *Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование*, 2: 293–302 [Nikolaev S. I., Karapetyan A. K., Pleshakova I. G., Struk A. N., Struk M. V. (2018) Comparative chemical composition and nutrition of grain of corn and sorgho. *News of the Nizhnevolzhsky Agro-University Complex: Science and Higher Professional Education* [Izvestiya Nizhnevolzhskogo agrouniversitetskogo kompleksa: nauka i vysshee professional'noe obrazovanie], 2: 293–302 (in Russian)]

Новикова И. В., Яковлев А. Н., Востриков С. В., Чернышов А. В., Митрофанова Е. К. (2007) Состав сахаросодержащего сырья для производства этанола. *Производство спирта и ликероводочных изделий*, 1: 27–29 [Novikova I. V., Yakovlev A. N., Vostrikov S. V., Chernyshov A. V., Mitrofanova E. K. (2007) Structure of sacchariferous raw material for manufacture of ethanol. *Production of Alcohol and Alcoholic Beverages* [Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdelii], 1: 27–29 (in Russian)]

ОФС.1.2.3.0022.15 Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования [OFS.1.2.3.0022.15 Determination of amine nitrogen by formol and iodometric titration methods (in Russian)]

Поляков В. А., Абрамова И. М., Полыгалина Г. В., Римарева Л. В., Корчагина Г. Т., Пискарева Е. Н. (2007) *Инструкция по теххимическому и микробиологическому контролю спиртового производства*. М., ДеЛи принт, 480 с. [Polyakov V. A., Abramova I. M., Polygalina G. V., Rimareva L. V., Korchagina G. T., Piskareva E. N. (2007) *Instructions for technochemical and microbiological control of alcohol production*. Moscow, DeLi Print, 480 p. (in Russian)]

Римарева Л. В., Оверченко М. Б., Игнатов Н. И. (2008) Микробная конверсия растительного сырья и вторичных сырьевых ресурсов АПК в высокоэффективный лизино-белковый препарат. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 12: 48–51 [Rimareva L. V., Overchenko M. B., Ignatov N. I. (2008) Microbial conversion of plant raw material and secondary raw material resources of the agro-industrial complex into a highly effective lysine-protein preparation. *Storage and processing of agricultural raw material*, 12: 48–51]

Ignatova N.I. (2008) Microbic conversion of vegetative raw materials and secondary source of raw materials of agrarian and industrial complex in highly effective lysine-albuminous preparation. *Storage and Processing of Farm Products* [Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya], 12: 48–51 (in Russian)]

Римарева Л. В., Григорьев М. А. (2009) Создание безотходной технологии в свете ответственности производителей за переработку сырьевых отходов на примере пивоваренного производства. *Экология промышленного производства*, 1: 43–46 [Rimareva L. V., Grigoriev M. A. (2009) Creating a waste-free technology in the light of the responsibility of producers for the processing of raw waste, using brewing production as the example. *Industrial Ecology* [Ekologiya promyshlennogo proizvodstva], 1: 43–46 (in Russian)]

Римарева Л. В., Оверченко М. Б., Дормашова С. С. (2010) Экспресс-метод определения лизина на основе тонкослойной хроматографии с целью оперативного контроля качества кормов. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 7: 31–34 [Rimareva L. V., Overchenko M. B., Dormashova S. S. (2010) Definition express method lizin on a basis slim-layer a chromatography for the purpose of operative quality assurance of forages. *Storage and Processing of Farm Products* [Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya], 7: 31–34 (in Russian)]

Римарева Л. В., Серба Е. М., Соколова Е. Н., Борщева Ю. А., Игнатова Н. И. (2017) Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности. *Вопросы питания*, 86(5): 63–74 [Rimareva L. V., Serba E. M., Sokolova E. N., Borshcheva Yu. A., Ignatova N. I. (2017) Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. *Voprosy Pitaniia*, 86(5): 63–74 (in Russian)]

Родионова Н. А., Капрельянц Л. В., Середницкий П. В., Килимник А. Ю. (1992) Гемиллюлозы зерна злаков и ферменты, катализирующие их расщепление. *Прикладная биохимия и микробиология*, 28(5): 645–664 [Rodionova N. A., Kaprel'iants L. V., Serebnitskii P. V., Kilimnik A. I. (1992) Hemicelluloses of cereal grains and enzymes, catalyzing their cleavage (review). *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 28(5): 645–664 (in Russian)]

Серба Е. М., Поляков В. А. (2015) *Биотехнологические основы комплексной переработки зернового сырья и вторичных биоресурсов в этанол и белково-аминокислотные добавки*. М, ВНИИПБТ, 133 с. [Serba E. M., Polyakov V. A. (2015) *Biotechnological basis of combined processing of grain raw materials and secondary bioresources into ethanol and protein-amino acid supplements*. Moscow, All-Russian Research Institute of Food Biotechnology, 133 p. (in Russian)]

Серба Е. М., Абрамова И. М., Римарева Л. В., Оверченко М. Б., Игнатова Н. И., Грунин Е. А. (2018) Влияние ферментных препаратов на технологические показатели зернового сусла и качество спирта. *Пиво и напитки*, 1: 50–54 [Serba E. M., Abramova I. M., Rimareva L. V., Overchenko M. B., Ignatova N. I., Grunin E. A. (2018) Influence of enzymatic preparations on technological parameters of grain wort and quality of alcohol. *Beer and Beverages* [Pivo i napitki], 1: 50–54 (in Russian)]

Серба Е. М., Оверченко М. Б., Игнатова Н. И., Римарева Л. В. (2019) Сравнительные исследования штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, перспективных для сбраживания концентрированного зернового сусла. *Актуальные вопросы индустрии напитков*, 3: 201–207 [Serba E. M., Overchenko M. B., Ignatova N. I., Rimareva L. V. (2019) Comparative studies of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains, promising for concentrated grain wort fermentation. *Current Issues of the Beverage Industry* [Aktual'nye voprosy industrii napitkov], 3: 201–207 (in Russian)]

Alhajturki D., Aljamali M., Kanbar A., Azmah F. (2012) Potential of some sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) genotypes under two water regimes for sugar and bio-ethanol production. *Sugar Tech*, 14(4): 376–382

Bahadure D. M., Marker S., Umakanth A. V., Prabhakar, Patil J. V., Synrem G. J. (2014) Assessment of genetic diversity for biomass related traits in Sweet Sorghum (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench). *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7(8): 32–34

Guillaume A., Thorigné A., Carré Y., Vinh J., Levavasseur L. (2019) Contribution of proteases and cellulases produced by solid-state fermentation to the improvement of corn ethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(11): 7

Kruger J., Oelofse A., Taylor J., Taylor J. R. N. (2012) Potential for improvement in yeast nutrition in raw whole grain sorghum and maize lager brewing and bioethanol production through grain genetic modification and phytase treatment. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(1): 70–75

Nahar K. (2011) Sweet sorghum: an alternative feedstock for bioethanol. *Iranica Journal of Energy & Environment*, 2(1): 58–61

Oyier M. O., Owuoché J. O., Oyoo M. E., Cheruiyot E., Mulianga B., Rono J. (2017) Effect of harvesting stage on sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) genotypes in Western Kenya. *Scientific World Journal*, 2017: 8249532

Sanjana Reddy P., Reddy B., Srinivasa Rao P. (2011) Genetic analysis of traits contributing to stalk sugar yield in sorghum. *Cereal Research Communications*, 39(3): 453–464

DOI 10.17516/1997-1389-0393

EDN: ORAYUP

УДК 639.3.043.2

Amino Acid Composition of Prospective Food Items for Rainbow Trout Aquaculture in Krasnoyarsk Region

Anzhelika A. Kolmakova^a and Vladimir I. Kolmakov^{*a, b}

^aInstitute of Biophysics SB RAS

Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”

Krasnoyarsk, Russian Federation

^bSiberian Federal University

Krasnoyarsk, Russian Federation

Received 16.07.2021, received in revised form 14.12.2021, accepted 12.02.2022

Abstract. Trout farming has a potential for becoming the primary source of high-quality fish products for the resident population of Krasnoyarsk Krai. Rainbow trout aquaculture is economically profitable if cheap balanced feed based on local ingredients is available. The article presents data on the composition of amino acids in imported and locally produced commercial fish feed, as well as alternative sources, such as flour, seed meal, by-products of biotechnological production, and aquatic organisms from the water bodies of Krasnoyarsk and the Yenisei River. We conclude that zooplankton and *Gammarus lacustris* G. O. Sars 1863 can provide rainbow trout with a diet balanced in amino acids, with the exception of methionine. The studied feed components from local plant biomass, by-products of biotechnological production, river macrozoobenthos and phytoplankton from local water bodies can be used as protein supplements for designing rainbow trout diets. Information presented in the article will be useful for fish farmers and practitioners involved in the development of new domestic fish feed.

Keywords: amino acids, rainbow trout, fish feed, fishmeal, diet, aquaculture.

Acknowledgements. The results were obtained with the financial support of the Krasnoyarsk Regional State Autonomous Institution “Krasnoyarsk Regional Fund for the Support of Scientific and Scientific and Technical Activities” as part of research under the project “Development of import-substituting technologies for salmon aquaculture in the conditions of the Krasnoyarsk Territory”. An automatic

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: vkolmakov@sfu-kras.ru

ORCID: 0000-0003-4926-1212 (Kolmakova A.)

amino acid analyzer LA8080 Hitachi in the shared facility of the Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”, was used in the study.

Citation: Kolmakova A. A., Kolmakov V. I. Amino acid composition of prospective food items for rainbow trout aquaculture in Krasnoyarsk region. *Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2022, 15(3), 363–377. DOI: 10.17516/1997-1389-0393



Состав аминокислот в перспективных компонентах питания радужной форели в условиях аквакультуры Красноярского края

А. А. Колмакова^а, В. И. Колмаков^{а, б}

^а*Институт биофизики СО РАН,
ФИЦ “Красноярский научный центр СО РАН”
Российская Федерация, Красноярск*
^б*Сибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. Форелеводство может стать основой для обеспечения населения Красноярского края высококачественной рыбной продукцией. Для экономически эффективного выращивания радужной форели в сибирских условиях необходимо разработать дешевые корма на основе местных компонентов со сбалансированным содержанием аминокислот. В статье представлены данные о составе аминокислот в коммерческих кормах для рыб от зарубежных и местных производителей, в муке сельскохозяйственных растений, шроте масличных культур, побочных продуктах биотехнологического производства, а также фитопланктоне, зоопланктоне, макрозообентосе из водоемов Красноярска и реки Енисей. Результаты исследований позволяют сделать вывод о том, что зоопланктон и *Gammarus lacustris* G. O. Sars 1863 могут обеспечить сбалансированное по аминокислотам питание радужной форели за исключением метионина. Исследованные кормовые компоненты из местного растительного сырья, побочные продукты биотехнологического производства, речной макрозообентос и фитопланктон красноярских водоемов могут быть использованы при разработке рационов питания радужной форели в качестве кормовых белковых добавок. Предполагается, что представленная в статье информация будет полезна для рыбоводов и практиков, занимающихся разработкой новых отечественных кормов для рыб.

Ключевые слова: аминокислоты, радужная форель, корм для рыб, рыбная мука, рацион питания, аквакультура.

Благодарности. Результаты получены при финансовой поддержке краевого государственного автономного учреждения “Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности” в рамках выполнения научных исследований и разработок по проекту “Разработка импортозамещающих технологий для аквакультуры лососевых рыб в условиях Красноярского

края”. В исследовании использовано оборудование ЦКП ФИЦ КНЦ СО РАН автоматический аминокислотный анализатор LA8080 Hitachi.

Цитирование: Колмакова, А. А. Состав аминокислот в перспективных компонентах питания радужной форели в условиях аквакультуры Красноярского края / А. А. Колмакова, В. И. Колмаков // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 363–377. DOI: 10.17516/1997-1389-0393

Введение

В зарубежной литературе и некоторых русскоязычных изданиях радужную форель относят к роду *Oncorhynchus* (*O. mykiss*, Walbaum, 1792, Salmonidae, Salmoniformes). Однако генетические исследования показали, что радужная форель достаточно далеко дивергировала от типичных представителей рода *Oncorhynchus* (Зелинский, Махров, 2001). Поэтому в отечественной литературе этот сложный полиморфный вид, отличающийся фенотипическим и генетическим разнообразием, принято называть *Parasalmo* (*Oncorhynchus*) *mykiss* (Pavlov et al., 2019). В настоящее время в мировой аквакультуре используются десятки пород радужной форели, из них семь в России, которые отличаются пониженным уровнем генетического разнообразия по сравнению с природными популяциями этого вида (Артамонова и др., 2016).

Несмотря на сложности таксономической и селекционной идентификации радужной форели, этот вид является основным объектом пресноводного рыбоводства в России и Красноярском крае на протяжении последних десятилетий. Успешность выращивания данного вида с целью получения товарной продукции связана с его высокой адаптивной способностью и скоростью роста в условиях аквакультуры. Даже в суровых сибирских климатических условиях товарное выращивание радужной форели индустриальным (садковым) или пастбищным способом может приносить существенную экономическую прибыль для хозяйствующих субъектов.

В практике садкового выращивания радужной форели в Красноярском крае реализованы разные модели, из которых можно выделить три основные. Первая модель – в незамерзающих теплых водах водоемов-охладителей тепловых энергетических станций в холодное время года, как правило, с сентября по июнь. Например, в подводящем канале Назаровской ГРЭС или Берешском водохранилище (водоем-охладителе Березовской ГРЭС). Вторая модель – круглогодичное выращивание на незамерзающих зимой участках рек, расположенных после гидростанций. Например, на незамерзающем участке реки Енисей в районе поселка Березовка и острова Отдыха города Красноярска. Третья модель – круглогодичное выращивание на глубоководных участках заливов Красноярского водохранилища (например, в районе поселка Приморск). Во всех моделях садкового способа основное питание рыбы получают за счет искусственного кормления.

Пастбищное выращивание, как правило, осуществляется в безрыбных непроточных малых водоемах в течение периода открытой воды с апреля по октябрь. При посадке в водоем весной рыбы около 100 г ее вес осенью может достигать 500–800 г. То есть темп роста форели довольно высокий. Основу спектра питания при пастбищном способе выращивания составляет природный рачковый зоопланктон и макрозообентос.

Таким образом, Красноярский край обладает богатыми и подходящими для выращи-

вания форели водными объектами. Однако разведение радужной форели в крае не получает должного развития из-за отсутствия на рынке эффективных дешевых отечественных кормов. Обладающие достойным качеством импортные сухие комбинированные корма и рыбная мука, широко применяемая для искусственного питания рыб, имеют растущий спрос на мировом рынке и высокие цены. В сложившейся ситуации представляется актуальным поиск новых перспективных компонентов для рационов питания радужной форели в сибирских условиях.

В мировой литературе последних лет в качестве компонентов искусственного питания форели предлагается использовать широкий спектр объектов: наземные и водные растения, водные и наземные беспозвоночные животные, микроорганизмы, побочные продукты мясного и биотехнологического производства и др. (напр., Mastoraki et al., 2020; Yang et al., 2021). Следовательно, на территории Красноярского региона, богатого водными биологическими ресурсами, обладающего высокоразвитой промышленностью и сельским хозяйством, имеются хорошие перспективы для развития производства экономически выгодных полноценных рационов или компонентов питания форели из местного сырья.

Пищевая и потребительская ценность товарной форели во многом определяется сбалансированным составом незаменимых и заменимых аминокислот (АК) в теле рыб. Поэтому корм для рыб считается полноценным, если в нем присутствуют все незаменимые и заменимые АК, причем также в сбалансированном состоянии (Li et al., 2009). В практике аквакультуры принято, что состав АК в корме должен соответствовать составу АК тела определенного вида рыб, этим кормом питающегося (Mambrini, Kaushik, 1995). Под составом АК традиционно понимают

“процентный состав”, где содержание каждой АК приводится в процентах от суммарного содержания АК. Поэтому обязательным этапом при разработке эффективных рационов питания должен быть сравнительный анализ состава АК компонентов корма. Каждая АК выполняет в организме определенную роль. Для хищной форели даже небольшой недостаток в рационе отдельных АК может привести к резкому снижению скорости роста и развития рыб.

Цель работы – оценить возможность включения в рацион радужной форели дешевых местных кормовых компонентов для сбалансированности аминокислотного состава питания при выращивании товарной рыбы в сибирских условиях. Для достижения цели был определен состав АК в местных перспективных кормовых объектах и проведено его сравнение с составом АК в теле радужной форели, эталонной рыбной муки и импортных гранулированных сухих кормов. Предполагается, что полученная информация будет востребована рыбоводами и практиками-биотехнологами при создании доступных местных кормов.

Методика

Был проанализирован состав АК 9-ти видов импортных сухих гранулированных кормов и 3-х видов экструдированных кормов местного производства, которые применяются на практике для искусственного вскармливания взрослых разновозрастных групп форелей (за исключением личинок и мальков). Данные корма были предоставлены в неповрежденной промышленной упаковке сибирскими предприятиями, занимающимися разведением радужной форели. Названия кормов были зашифрованы.

В естественном ареале обитания радужная форель предпочитает питаться рач-

ковым зоопланктоном и макрозообентосом (Kasumyan, Tinkova, 2013). Пробы зоопланктона и макрозообентоса отбирались классическими гидробиологическими методами из реки Енисей. Считается, что состав АК водных беспозвоночных (зоопланктон, макрозообентос) в естественных условиях генетически предопределен, однако может существенно меняться в течение вегетационного сезона под влиянием изменчивых условий питания. Поэтому отбор проб зоопланктона и макрозообентоса проводили еженедельно с мая по октябрь. В лаборатории организмы макрозообентоса трех доминантных групп (гаммарусы Gammaridea, личинки ручейников Trichoptera, личинки хирономид Chironomidae) отбирали из нефиксированных проб, определяли и помещали в стаканы с фильтрованной водой для очищения их кишечника на 24 ч. Затем с поверхности тел животных удаляли лишнюю влагу с помощью фильтровальной бумаги. Пробы фитопланктона отбирали в течение вегетационного сезона из небольших по размерам мезотрофного и эфтрофного водоемов города Красноярска.

В качестве частичной замены традиционной рыбной муки для кормления форели предлагается применять муку подсолнечника, льна и пшеницы, рапсовый и рыжиковый шроты, пшеничный глютен, послеспиртовую барду и пивные дрожжи. Выбор на эти пищевые объекты был сделан исходя из их доступности и невысокой цены на региональном рынке. В литературе имеются сведения о возможности применения данных пищевых компонентов в питании рыб (Кононова и др., 2016; Kolmakov, Kolmakova, 2020). Растительные (шроты, мука) и микробиологические компоненты (барда послеспиртовая, дрожжи) были предоставлены сотрудниками сельскохозяйственных предприятий и Красноярского государственного аграрного университета.

Среднюю пробу высушивали и измельчали в ступке. Высушивание проб проводили в сушильном шкафу при температуре 60–65 °С до воздушно-сухого состояния. Подготовленные пробы хранили в эксикаторе. Для определения АК в пробе проводили гидролиз в 6 N растворе соляной кислоты. Навеску пробы массой от 3 до 5 мг взвешивали в виале (объем 2 мл), приливали 1–1,5 мл раствора 6 N соляной кислоты. Виалу продували аргоном (для вытеснения воздуха), плотно закручивали крышкой и помещали в предварительно нагретую до температуры 110 °С песочную баню на 22 ч. После завершения гидролиза виалы охлаждали до комнатной температуры, взбалтывали и содержимое переносили на фильтр. Стенки виалы дважды промывали дистиллированной водой. Смывы также переносили на фильтры. Фильтрат выпаривали в выпарительной чашке на кипящей водяной бане до образования мокрого осадка. Затем к осадку, добавляли 2 мл дистиллированной воды и снова выпаривали для удаления следов соляной кислоты. Выпаренные образцы хранили в эксикаторе над гранулированной щелочью (NaOH или KOH) до анализа. Перед анализом сухой гидролизат (пробу), содержащий смесь аминокислот, растворяли в буфере из расчета 1 мг исходного белка в 1 мл буфера с pH 2,2. Как правило, пробы растительного и животного происхождения содержат в своем составе гидрофобные вещества, отравляющие колонку и мешающие разделению. Для освобождения от них использовали картриджи, заполненные слабогидрофобным силикагелем. Через картридж (Диапак С-1) пропускали раствор гидролизата в 5 % -ном растворе диметилсульфоксида в буфере, используемом для разведения проб. Перед анализом пробу фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Определение состава АК проводили на автоматическом анализаторе LA8080

Hitachi (Япония) методом ВЭЖХ с постколоночной модификацией нингидрином (Moore, Stein, 1954). Сущность метода заключается в расщеплении белков на АК с помощью гидролиза, последующим разделением смеси аминокислот на хроматографической колонке, смешиванием элюата с нингидрином для проведения реакции с получением окрашенных продуктов и детектированием компонентов фотометрическим детектором. Для количественной оценки АК непосредственно перед анализом серии проб в тех же условиях проводили анализ стандартной смеси аминокислот с известной концентрацией (Pickering calibration standart). В результате получали хроматограммы с пиками семнадцати АК: лизин, гистидин, аргинин, треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, пролин, серин, глютаминовая кислота, глицин, аланин, цистин, тирозин. В процессе кислотного гидролиза триптофан практически полностью разрушался, цистеин окислялся в цистин, аспарагин и глутамин превращались в аспарагиновую и глютаминовую кислоту соответственно. Многомерное непараметрическое шкалирование состава пищевых объектов выполняли в R с помощью пакета vegan (R Core Team, 2020).

Результаты

Из табл. 1 и рис. 1 следует, что по составу незаменимых и заменимых АК потребностям радужной форели наиболее соответствовали принятая в качестве эталона среди кормов рыбная мука и зоопланктон красноярских водоемов. Однако если у рыбной муки состав АК был ближе всех к составу форели и практически полностью соответствовал ее пищевым потребностям, то у зоопланктона было достоверно меньше незаменимого метионина, чем требуется радужной форели для сба-

лансированного питания ($p < 0,05$). В исследованных на состав АК пробах зоопланктона по биомассе доминировали *Daphnia pulicaria* Forbes, 1893 (Cladocera), *Cyclops abyssorum* G.O. Sars, 1863 (Copepoda: Cyclopoida) и *Diaptomus cyaneus* Gurney, 1909 (Copepoda: Calanoida).

В целом по суммарному процентному составу незаменимых АК речной макрозообентос и зоопланктон красноярских водоемов были близки (табл. 1), но по содержанию отдельных АК потребностям форели наиболее соответствовал зоопланктон. В составе АК зоопланктона содержание метионина и цистеина было на порядок больше, чем у макрозообентоса из р. Енисей (Trichoptera+Gammaridea+Chironomidae). Пробы смешанного речного макрозообентоса содержали недостаточно метионина, цистеина и пролина для потребности форели, а тирозин присутствовал в избытке (табл. 1). Особенно большой дефицит наблюдался у речного макрозообентоса по метионину и цистеину, содержание которых было на порядок меньше, чем у радужной форели.

Состав АК *Gammarus lacustris* G.O. Sars 1863 был рассчитан на основе объединения литературных данных и результатов собственных исследований гаммарусов из красноярских водоемов. Из табл. 1 следует, что состав АК *G. lacustris* лучше соответствовал таковому радужной форели, чем смешанный состав речного макрозообентоса. Так, у *G. lacustris* содержание цистеина и пролина было достоверно выше, чем в пробах смешанного речного макрозообентоса ($p < 0,05$). Однако содержание метионина и цистеина в теле *G. lacustris* все же было недостаточно для полноценного питания форели.

В составе АК исследованных импортных и местных кормов было достоверно меньше метионина и лизина, по сравнению с содер-

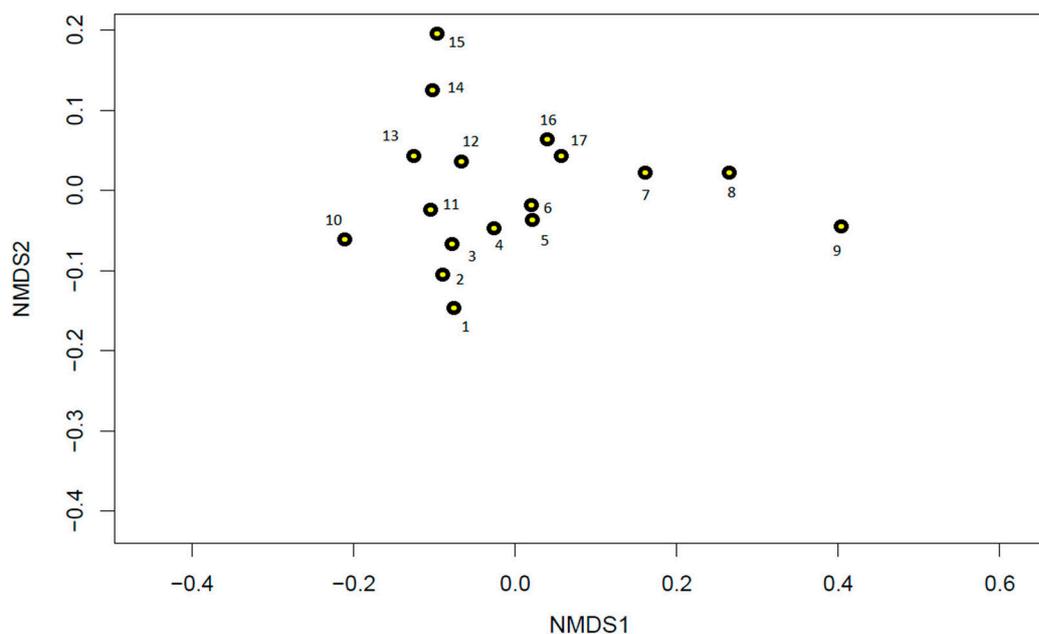


Рис. 1. Анализ состава незаменимых аминокислот в объектах питания форели методом многомерного непараметрического шкалирования (NMDS).

Цифрами отмечены номера образцов: 1 – радужная форель, 2 – рыбная мука, 3 – зоопланктон, 4 – гранулированный импортный корм, 5 – шрот рапсовый, 6 – шрот рыжиковый, 7 – барда послеспиртовая, 8 – мука пшеничная, 9 – пшеничный глютен, 10 – речной макрозообентос, 11 – *Gammarus lacustris*, 12 – дрожжи пивные, 13 – коммерческий корм местного производства, 14 – фитопланктон мезотрофного водоема, 15 – фитопланктон эвтрофного водоема, 16 – мука льняная, 17 – мука подсолнечника.

Fig. 1. Non-metric multidimensional scaling analysis of essential amino acid composition of trout food items.

The numbers refer to the following samples: 1 – rainbow trout, 2 – fishmeal, 3 – zooplankton, 4 – granulated imported feed, 5 – rapeseed meal, 6 – camelina meal, 7 – post-alcohol bard, 8 – wheat flour, 9 – wheat gluten, 10 – river macrozoobenthos, 11 – *Gammarus lacustris*, 12 – brewer's yeast, 13 – commercial feed of local production, 14 – phytoplankton of a mesotrophic water body, 15 – phytoplankton of an eutrophic water body, 16 – flaxseed flour, 17 – sunflower flour

жанием АК в теле форели (табл. 1, $p < 0,05$). В местных кормах было недостаточно также гистидина, а глутаминовая кислота была в избытке для потребности форели. Гранулированные сухие корма импортного производства содержали примерно в три раза больше метионина, чем экструдированные корма местного производства. В целом по составу незаменимых АК импортный корм был ближе к природному зоопланктону и *G. lacustris*, чем местный корм.

Радужная форель – это хищник, поэтому растительные компоненты и побочные продукты биотехнологического производства

могут быть использованы только как добавки к основному корму из рыбной муки или водным беспозвоночным. Полученные данные (табл. 2) свидетельствуют, что в местных растительных компонентах и побочных биотехнологических продуктах недостаточное суммарное содержание незаменимых АК. Во всех исследованных образцах было меньше незаменимых гистидина, лизина, метионина, но больше заменимой глутаминовой кислоты и серина, чем требуется радужной форели. По содержанию лизина ближе к потребностям форели были шроты рапсовый и рыжиковый, дрожжи пивные. Состав АК пшеничного глю-

Таблица 1. Состав аминокислот (среднее \pm SE, % от суммы) в коммерческих кормах и природных пищевых объектах питания радужной форели
 Table 1. Amino acid composition (mean \pm SE, % of the sum) in industrial aquafeed and natural food items of rainbow trout

	Коммерческий корм для аквакультуры				Природные объекты питания		
	Радужная форель* (n=4)	Рыбная мука** (n=6)	Импортное производство, гранулы (n=9)	Местное производство, мука (n=3)	Gammaus lacustris*** (n=4)	Зоопланктон (n=16)****	Речной макрозообентос (Trichoptera+Gamma ridea+Chironomidae, n=77)*****
Аргинин	6,83 \pm 0,64	6,57 \pm 0,32	5,77 \pm 0,15	7,84 \pm 1,23	6,15 \pm 0,53	6,85 \pm 0,29	7,07 \pm 0,50
Гистидин	3,10 \pm 0,08	3,09 \pm 0,41	2,77 \pm 0,08	2,11 \pm 0,19	2,54 \pm 0,29	2,55 \pm 0,21	3,26 \pm 0,06
Изолейцин	5,41 \pm 0,51	4,22 \pm 0,15	3,82 \pm 0,12	3,64 \pm 0,10	4,19 \pm 0,30	4,48 \pm 0,13	4,64 \pm 0,05
Лейцин	8,59 \pm 0,59	8,40 \pm 0,60	8,94 \pm 0,22	7,21 \pm 0,08	7,41 \pm 0,49	7,70 \pm 0,31	7,60 \pm 0,10
Лизин	8,37 \pm 0,45	7,53 \pm 0,45	5,97 \pm 0,21	6,20 \pm 0,68	7,18 \pm 0,87	8,45 \pm 0,56	7,16 \pm 0,56
Метионин	3,54 \pm 0,37	3,09 \pm 0,19	1,03 \pm 0,18	0,29 \pm 0,29	1,56 \pm 0,43	1,91 \pm 0,19	0,34 \pm 0,13
Фенилаланин	4,53 \pm 0,51	4,37 \pm 0,15	4,98 \pm 0,07	3,75 \pm 0,18	4,69 \pm 0,46	4,20 \pm 0,16	5,04 \pm 0,09
Треонин	4,21 \pm 0,32	4,42 \pm 0,16	3,16 \pm 0,66	3,88 \pm 1,50	4,97 \pm 0,20	4,91 \pm 0,21	5,78 \pm 0,11
Валин	5,56 \pm 0,48	4,99 \pm 0,21	4,98 \pm 0,15	5,07 \pm 0,21	5,36 \pm 0,19	5,59 \pm 0,15	5,65 \pm 0,08
Σ(незаменимые АК)	50,2	46,7	41,4	40,0	44,0	46,6	46,5
Аланин	6,34 \pm 0,18	6,96 \pm 0,30	6,32 \pm 0,18	7,82 \pm 0,81	7,36 \pm 1,44	7,31 \pm 0,39	6,62 \pm 0,17
Аспарагин	10,1 \pm 0,25	9,40 \pm 0,64	9,13 \pm 0,16	9,64 \pm 0,65	10,3 \pm 0,96	10,1 \pm 0,23	10,9 \pm 0,17
Цистеин	1,23 \pm 0,20	0,98 \pm 0,12	1,08 \pm 0,04	0,44 \pm 0,26	0,63 \pm 0,23	1,53 \pm 0,15	0,14 \pm 0,03
Глутаминовая к-та	12,9 \pm 1,16	15,2 \pm 1,18	19,8 \pm 0,64	17,2 \pm 0,92	14,9 \pm 1,33	14,1 \pm 0,24	13,6 \pm 0,17
Глицин	6,47 \pm 0,95	6,80 \pm 0,75	6,02 \pm 0,21	10,6 \pm 1,41	6,82 \pm 1,03	5,89 \pm 0,23	5,32 \pm 0,07
Пролин	4,46 \pm 0,39	5,73 \pm 0,65	7,09 \pm 0,18	6,50 \pm 0,08	5,22 \pm 0,42	5,53 \pm 0,20	2,92 \pm 0,06
Серин	4,33 \pm 0,09	4,73 \pm 0,56	5,70 \pm 0,22	5,30 \pm 0,06	5,38 \pm 0,26	4,61 \pm 0,18	4,93 \pm 0,07
Тирозин	3,86 \pm 0,39	3,58 \pm 0,24	3,40 \pm 0,08	2,47 \pm 0,28	4,69 \pm 0,63	4,30 \pm 0,36	9,06 \pm 0,24
Σ (заменимых АК)	49,8	53,3	58,6	60,0	56,0	53,4	53,5

Источники: *(Tacon, Metian, 2013; Rahimzade et al., 2019; Kumar et al., 2020; Lee et al., 2020); ** (Baer et al., 2012; Barnes et al., 2013; Ma et al., 2014; Riche, 2015; Xie et al., 2016; Psafakis et al., 2020); *** (Driver et al., 1974; Mathias et al., 1982; неопубликованные данные); **** (Kolmakova, Kolmakov, 2019); ***** (Kolmakova et al., 2013; неопубликованные данные).

тена наименее всех исследованных образцов соответствовал таковому у форели: пролина и глутаминовой кислоты было почти в три раза больше, а треонина на порядок меньше, чем в теле радужной форели (табл. 2, рис. 1). Существенные различия в составе незаменимых АК, по сравнению с потребностью радужной форели, были обнаружены в муке пшеничной и барде спиртовой. Данные образцы имели в составе АК недостаточно не только гистидина, лизина и метионина, но и аргинина.

Фитопланктон имел наименее подходящий состав АК для полноценного питания радужной форели, по сравнению с исследованными водными беспозвоночными, растительными образцами и побочными продуктами производства (табл. 3). Во всех исследованных пробах фитопланктона, независимо от статуса водоема, было меньше незаменимых гистидина, лизина, метионина, чем требуется радужной форели ($p < 0,05$). И наоборот, содержание заменимых аланина и серина было выше, чем в теле радужной форели. В составе фитопланктона эвтрофного водоема по биомассе доминировали цианобактерии *Anabaena flos-aquae* (L.) Ralfs и *Planktothrix agardhii* (Gom.) et Kot., а мезотрофного водоема – представители диатомовых микроводорослей *Stephanodiscus hantzschii* Grun., *Synedra acus* Kutz., *Asterionella formosa* Hass. и динофитовые микроводоросли рода *Peridinium*. Следовательно, видимые из табл. 3 различия в составе АК фитопланктона эвтрофного и мезотрофного водоемов определяются спецификой цианобактерий и планктонных микроводорослей (Kolmakova, Kolmakov, 2019). Фитопланктон эвтрофного водоема содержал мало незаменимого аргинина: в три раза меньше, чем фитопланктон мезотрофного водоема, и в два раза меньше, чем радужная форель (табл. 3). В целом по составу незаменимых АК кор-

мовая ценность для радужной форели фитопланктона мезотрофного водоема выше, чем фитопланктона эвтрофного водоема (рис. 1).

Обсуждение результатов

За исключением рыбной муки, все исследованные образцы и пробы не соответствовали пищевым потребностям радужной форели по составу метионина. Необходимость содержания метионина в достаточном количестве в кормах для радужной форели многократно описана в литературе (напр., Boonyoung et al., 2013). Известно, что метионин влияет на экспрессию генов, связанных с ростом и метаболизмом у рыб (Fontagne-Dicharry et al., 2017). Поэтому кормовую ценность исследованных образцов и проб для питания радужной форели следует увеличивать за счет добавления синтетического метионина или других пищевых компонентов, имеющих высокое содержание данной АК.

Согласно полученным результатам по составу АК зоопланктон более подходит для полноценного питания радужной форели, чем макрозообентос. Недавно для субарктических водоемов также было показано, что пелагиальный зоопланктон по составу АК является более ценной пищей для лососевых рыб, чем прибрежный макрозообентос (Vesterinen et al., 2021). Очевидно, что наблюдаемые различия в составе АК макрозообентоса и зоопланктона связаны с различиями в их питании. Первый преимущественно питается фитоперифитомом, второй – фитопланктоном. В целом водные беспозвоночные из местных сибирских водоемов могут быть основной пищей радужной форели в аквакультуре, так как содержат в достаточном количестве большинство отдельных АК. Однако для полноценного питания рационы из водных беспозвоночных следует обогащать пищевыми добавками, содержащими

Таблица.2. Состав аминокислот (среднее \pm SE,% от суммы) перспективных компонентов пищи для аквакультуры радужной форели в условиях Красноярского края

Table 2. Amino acid composition (mean \pm SE,% of total) of potential food items for rainbow trout aquaculture in Krasnoyarsk region

	Радужная форель*	Мука подсолнечника	Мука пшеничная	Мука льняная	Шрот рапсовый	Шрот рыжиковый	Пшеничный глютен	Барда после-спиртовая	Дрожжи пивные
Аргинин	6,83 \pm 0,64	8,47	3,49	9,78	6,81	8,79	3,05	3,71	4,55
Гистидин	3,10 \pm 0,08	2,50	1,99	2,18	2,86	2,53	1,83	1,99	2,19
Изолейцин	5,41 \pm 0,51	3,47	2,62	3,87	4,59	3,74	3,30	3,05	4,77
Лейцин	8,59 \pm 0,59	6,95	6,59	6,34	7,98	7,26	6,86	7,89	7,89
Лизин	8,37 \pm 0,45	3,07	2,12	3,34	5,68	4,60	1,06	1,06	6,53
Метионин	3,54 \pm 0,37	0	0	0	0	1,21	0,81	0	0
Фенлаланин	4,53 \pm 0,51	4,83	4,47	4,89	4,31	4,39	5,08	4,84	4,59
Треонин	4,21 \pm 0,32	5,29	3,73	4,93	5,12	4,70	0,31	4,77	6,38
Валин	5,56 \pm 0,48	4,34	3,36	4,86	6,08	5,36	3,73	4,44	6,17
Σ(незаменимые АК)	50,2	38,9	28,4	40,2	43,4	42,6	26,0	31,8	43,1
Аланин	6,34 \pm 0,18	5,1	3,49	5,17	4,95	5,26	2,55	5,90	7,92
Аспарагин	10,1 \pm 0,25	10,6	4,73	10,6	8,70	9,34	3,16	7,89	10,7
Цистеин	1,23 \pm 0,20	1,55	1,49	1,37	1,85	1,94	2,02	1,72	0,97
Глутаминовая к-та	12,9 \pm 1,16	23,6	37,4	23,6	21,2	20,8	41,7	28,4	16,2
Глицин	6,47 \pm 0,95	6,78	4,11	6,72	5,68	5,85	3,42	5,96	5,45
Пролин	4,46 \pm 0,39	4,86	11,2	3,94	6,39	6,09	7,00	9,02	6,2
Серин	4,33 \pm 0,09	5,67	6,23	5,70	4,71	5,26	5,28	5,90	6,06
Тирозин	3,86 \pm 0,39	2,93	2,99	2,71	3,10	2,87	3,26	3,45	3,44
Σ (заменимых АК)	49,8	61,1	71,6	59,8	56,6	57,4	74,0	68,2	56,9

Источники: *(Tasop, Metian, 2013; Rahimzade et al., 2019; Kumar et al., 2020; Lee et al., 2020).

Таблица 3. Состав аминокислот (среднее \pm SE, % от суммы) радужной форели и природного фитопланктона водоемов Красноярского краяTable 3. Amino acid composition (mean \pm SE, % of the sum) of rainbow trout and natural phytoplankton in water bodies of Krasnoyarsk region

	Радужная форель* (n=4)	Фитопланктон эвтрофного водоема (n=18)**	Фитопланктон мезотрофного водоема (n=18)**
Аргинин	6,83 \pm 0,64	2,61 \pm 0,67	9,56 \pm 2,45
Гистидин	3,10 \pm 0,08	1,02 \pm 0,08	1,21 \pm 0,09
Изолейцин	5,41 \pm 0,51	4,46 \pm 0,26	3,44 \pm 0,14
Лейцин	8,59 \pm 0,59	9,39 \pm 0,51	6,35 \pm 0,29
Лизин	8,37 \pm 0,45	4,46 \pm 0,30	5,89 \pm 0,44
Метионин	3,54 \pm 0,37	0,93 \pm 0,07	0,28 \pm 0,07
Фенилаланин	4,53 \pm 0,51	3,42 \pm 0,32	3,54 \pm 0,16
Треонин	4,21 \pm 0,32	5,35 \pm 0,24	6,55 \pm 0,22
Валин	5,56 \pm 0,48	7,25 \pm 0,37	5,40 \pm 0,09
Σ(незаменимые АК)	50,2	38,9	42,2
Аланин	6,34 \pm 0,18	9,44 \pm 0,29	8,88 \pm 0,38
Аспарагин	10,1 \pm 0,25	12,1 \pm 0,38	11,3 \pm 0,36
Цистеин	1,23 \pm 0,20	н.д.	н.д.
Глутаминовая к-та	12,9 \pm 1,16	18,0 \pm 0,58	15,6 \pm 0,61
Глицин	6,47 \pm 0,95	7,72 \pm 0,53	7,02 \pm 0,23
Пролин	4,46 \pm 0,39	4,70 \pm 0,25	4,83 \pm 0,19
Серин	4,33 \pm 0,09	6,07 \pm 0,20	6,74 \pm 0,20
Тирозин	3,86 \pm 0,39	3,08 \pm 0,50	3,30 \pm 0,46
Σ (заменимых АК)	49,8	61,1	57,8

Источники: *(Tacon, Metian, 2013; Rahimzade et al., 2019; Kumar et al., 2020; Lee et al., 2020); **(Kalachova et al., 2004).

АК, лимитирующие рост и развитие товарной радужной форели.

Наряду с зоопланктоном особенно перспективный вид для кормления радужной форели – *G. lacustris*. Данный представитель отряда Gammaridea – доминант по биомассе среди макрозообентоса большинства красноярских водоемов. Под контролем и с учетом научных рекомендаций его можно вылавливать в коммерческих масштабах, достаточных для обеспечения потребностей рыбободных хозяйств. Важно, что природный зоопланктон и *G. lacustris* могут обеспечить радужную форель достаточным количеством лизина. Содержание лизина и метионина

в пище рыб является критически важным условием при разработке эффективных кормов (Kolmakov, Kolmakova, 2020). Радужная форель очень чувствительно реагирует на недостаток данных АК в пище, снижая показатели роста и размножения (Lee et al., 2020).

В условиях аквакультуры радужная форель легко переходит на гранулированный корм. По результатам нашего анализа АК состав импортных гранулированных кормов был ближе к природным объектам питания радужной форели (рис. 1), по сравнению с кормами местного производства.

Для достижения сбалансированности питания радужной форели в исследованные

корма импортного производства следует добавлять пищевые компоненты, содержащие метионин и лизин, а в местные корма – метионин, лизин и цистеин. В целом гранулированный импортный корм лучше соответствовал потребностям в питании форели, чем местный экструдированный корм, но обладал высокой ценовой стоимостью.

В настоящее время фитопланктон и компоненты растительного происхождения из урожая и переработки зерновых или масличных растений являются наиболее распространенными среди пищевых добавок в аквакультуре рыб. Из практики известно, что животные белки в сочетании с растительными компонентами хорошо дополняют друг друга по составу АК. В результате формируются рационы с учетом пищевых потребностей рыб. Состав незаменимых АК рапсового и рыжикового шротов, по сравнению с другими изученными растительными пищевыми объектами, наиболее соответствовал потребностям радужной форели. Содержание лизина в исследованных растительных образцах и пробах фитопланктона не превышало 70 % от потребности в данной АК радужной форели, а метионина – 35 %. Информация о недостаточном содержании отдельных АК в компонентах растительного происхождения часто встречается в литературе (напр., Zhou et al., 2020). Более того, доступность АК из растительной пищи может быть пониженной, по сравнению с кормом животного происхождения. Так, в экспериментах по кормлению радужной форели растительной пищей было показано, что в организме рыб снижалось содержание изолейцина, лейцина и валина, хотя в рационе этих АК было достаточно (Kumar et al., 2020).

Из исследованных побочных продуктов биотехнологического производства наибо-

лее оптимальный состав незаменимых АК для радужной форели имели пивные дрожжи. Содержание лизина в пивных дрожжах было больше, чем во всех исследованных растительных образцах и фитопланктоне. Пшеничный глютен по суммарному составу незаменимых АК мало соответствует потребностям радужной форели, но все же в перспективе может использоваться как пищевая добавка из-за наличия относительно высокого содержания метионина и фенилаланина.

Заключение

На территории Красноярского края имеются перспективы для производства кормов с полноценным аминокислотным составом для радужной форели, за счет включения в рационы дешевых местных кормовых компонентов. Обеспечение дешевыми сбалансированными кормами рыбопроизводных предприятий и хозяйств позволит увеличить товарное производство форели и снабжение населения недорогой продукцией местного производства. По аминокислотному составу в качестве основного корма для радужной форели могут быть использованы организмы зоопланктона и *G. lacustris*. В качестве пищевых добавок можно применять организмы макрозообентоса р.Енисей, фитопланктон из местных водоемов, продукты переработки сельскохозяйственного и биотехнологического производства: муку подсолнечника, льна и пшеницы, рапсовый и рыжиковый шроты, пшеничный глютен, послеспиртовую барду, пивные дрожжи. Учитывая важность метионина для роста и развития радужной форели, следует продолжить поиск потенциальных природных пищевых объектов, богатых метионином.

Список литературы / References

Артамонова В.С., Янковская В.А., Голод В.М., Махров А.А. (2016) Генетическая дифференциация пород радужной форели (*Parasalmo mykiss*), разводимых в Российской Федерации. *Труды Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН*, 73(76): 25–45 [Artamonova V.S., Yankovskaya V.A., Golod V.M., Makhrov A.A. (2016) Genetic differentiation of rainbow trout (*Parasalmo mykiss*) strains bred in the Russian federation. *Transactions of Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS* [Trudy Instituta biologii vnutrennikh vod im. I. D. Papanina RAN], 73(76): 25–45 (in Russian)]

Зелинский Ю.П., Махров А.А. (2001) Хромосомная изменчивость, реорганизации генома в филогенезе и систематические отношения благородных лососей *Salmo* и *Parasalmo* (Salmonidae). *Вопросы ихтиологии*, 41(2): 184–191 [Zelinsky Yu.P., Makhrov A.A. (2001) Chromosomal variability, genome reorganization in phylogeny, and the systematics of *Salmo* and *Parasalmo* species (Salmonidae). *Journal of Ichthyology*, 41(3): 209–216]

Кононова С.В., Муранова Т.А., Зинченко Д.В., Белова Н.А., Мирошников А.И. (2016) Биотехнологические подходы при использовании белков рапса и сои в кормах аквакультуры лососевых рыб. *Биотехнология*, 32(5): 57–68 [Kononova S.V., Muranova T.A., Zinchenko D.V., Belova N.A., Miroshnikov A.I. (2016) Biotechnological approaches when using protein rapeseed and soybeans in feed for salmonid aquaculture. *Biotechnology* [Biotekhnologiya], 32(5): 57–68 (in Russian)]

Barnes M.E., Brown M.L., Rosentrater K.A., Sewell J.R. (2013) Preliminary evaluation of rainbow trout diets containing PepSoyGen, a fermented soybean meal product, and additional amino acids. *The Open Fish Science Journal*, 6: 19–27

Bauer W., Prentice-Hernandez C., Tesser M.B., Wasielesky W., Poersch L.H.S. (2012) Substitution of fishmeal with microbial flocculant meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 342–343(1): 112–116

Boonyoung S., Haga Y., Satoh S. (2013) Preliminary study on effects of methionine hydroxy analog and taurine supplementation in a soy protein concentrate-based diet on the biological performance and amino acid composition of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. *Aquaculture Research*, 44(9): 1339–1347

Driver E.A., Sugden L.G., Kovach R.J. (1974) Calorific, chemical and physical values of potential duck foods. *Freshwater Biology*, 4(3): 281–292

Fontagne-Dicharry S., Alami-Durante H., Aragao C., Kayshik S.J., Geurden I. (2017) Parental and early-feeding effects of dietary methionine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 469: 16–27

Kalachova G.S., Kolmakova A.A., Gladyshev M.I., Kravchuk E.S., Ivanova E.A. (2004) Seasonal dynamics of amino acids in two small Siberian reservoirs dominated by prokaryotic and eukaryotic phytoplankton. *Aquatic Ecology*, 38(1): 3–15

Kasumyan A.O., Tinkova T.V. (2013) Taste attractiveness of different hydrobionts for roach *Rutilus rutilus*, bitterling *Rhodeus sericeus amarus*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Ichthyology*, 53(7): 499–508

Kolmakov V.I., Kolmakova A.A. (2020) Amino acids in prospective feeds for fish aquaculture: A review of experimental data. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 13(4): 424–442 (in Russian)

- Kolmakova A. A., Gladyshev M. I., Kalachova G. S., Kravchuk E. S., Ivanova E. A., Sushchik N. N. (2013) Amino acid composition of epilithic biofilm and benthic animals in a large Siberian river. *Freshwater Biology*, 58(10): 2180–2195
- Kolmakova A. A., Kolmakov V. I. (2019) Amino acid composition of green microalgae and diatoms, cyanobacteria, and zooplankton (review). *Inland Water Biology*, 12(4): 452–461
- Kumar V., Lee S., Cleveland B. M., Romano N., Lalgudi R. S., Benito M. R., McGraw B., Hardy R. W. (2020) Comparative evaluation of processed soybean meal (EnzoMeal™) vs. regular soybean meal as a fishmeal replacement in diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on growth performance and growth-related genes. *Aquaculture*, 516: 734652
- Lee S., Small B. C., Patro B., Overturf K., Hardy R. W. (2020) The dietary lysine requirement for optimum protein retention differs with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) strain. *Aquaculture*, 514: 734483
- Li P., Mai K., Trushenski J., Wu G. (2009) New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 37(1): 43–53
- Ma X., Wang F., Han H., Wang Y., Lin Y. (2014) Replacement of dietary fish meal with poultry by-product meal and soybean meal for golden pompano, *Trachinotus ovatus*, reared in net pens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(6): 662–671
- Mambrini M., Kaushik S. J. (1995) Indispensable amino acid requirements of fish: correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3–4): 240–247
- Mastoraki M., Molla Ferrandiz P., Vardali S. C., Kontodimas D. C., Kotzamanis Y. P., Gasco L., Chatzifotis S., Antonopoulou E. (2020) A comparative study on the effect of fish meal substitution with three different insect meals on growth, body composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 528: 735511
- Mathias J. A., Martin J., Yurkowski M., Lark J. G. I., Papst M., Tabachek J. L. (1982) Harvest and nutritional quality of *Gammarus lacustris* for trout culture. *Transactions of the American Fisheries Society*, 111(1): 83–89
- Moore S., Stein W. H. (1954) A modified ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 211(2): 907–913
- Pavlov S. D., Semenova A. V., Melnikova M. N. (2019) Differentiation of the Kamchatka rainbow trout *Parasalmo* (*Oncorhynchus*) *mykiss* populations by microsatellite DNA loci. *Biology Bulletin*, 46(2): 144–153
- Psofakis P., Karapanagiotidis I. T., Malandrakis E. E., Golomazou E., Exadactylos A., Mente E. (2020) Effect of fishmeal replacement by hydrolyzed feather meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and growth-related gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 521: 735006
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>
- Rahimzade E., Bahri A. H., Moini S., Zare D. N. (2019) Influence of vacuum packaging and frozen storage time on fatty acids, amino acids and $\omega-3/\omega-6$ ratio of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(4): 1083–1092
- Riche M. (2015) Nitrogen utilization from diets with refined and blended poultry by-products as partial fish meal replacements in diets for low-salinity cultured Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *Aquaculture*, 435: 458–466

Tacon A.G.J., Metian M. (2013) Fish matters: importance of aquatic foods in human and global food supply. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1): 22–38

Vesterinen J., Keva O., Kahilainen K.K., Strandberg U., Hiltunen M., Kankaala P., Taipale S.J. (2021) Nutritional quality of littoral macroinvertebrates and pelagic zooplankton in subarctic lakes. *Limnology and Oceanography*, 66(S 1): 81–97

Xie S.-W., Liu Y.-J., Zeng S., Niu J., Tian L.-X. (2016) Partial replacement of fish-meal by soy protein concentrate and soybean meal based protein blend for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 464: 296–302

Yang L., Li H., Lu Q., Zhou W. (2021) Emerging trends of culturing microalgae for fish-rearing environment protection. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(1): 31–37

Zhou Z., Yao W., Ye B., Wu X., Li X., Dong Y. (2020) Effects of replacing fishmeal protein with poultry by-product meal protein and soybean meal protein on growth, feed intake, feed utilization, gut and liver histology of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles. *Aquaculture*, 516: 734503

DOI 10.17516/1997-1389-0394

EDN: JGWSPO

УДК

**Fatty Acid Content and Composition
of Fly Larvae *Lucilia sericata* (Family Calliphoridae) Grown
on Diets with Different Content of Polyunsaturated Fatty Acids
and the Amino Acid Composition of this Species**

**Kirill N. Stoyanov^{a, b*}, Olesia N. Makhutova^{a, b},
Konstantin G. Malyshevsky^a, Elena V. Borisova^b,
Nadezhda N. Sushchik^{a, b}, Anzhelika A. Kolmakova^a,
Vasiliy N. Morgun^b and Michail I. Gladyshev^{a, b}**

^a*Institute of Biophysics SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”*

Krasnoyarsk, Russian Federation

^b*Siberian Federal University*

Krasnoyarsk, Russian Federation

Received 06.04.2021, received in revised form 17.09.2021, accepted 12.12.2021

Abstract. Aquaculture is a fast-growing branch of agriculture, but it faces fish feed shortages due to a decrease in wild fish catches. As a result, the price of feed increases. For further development it requires alternative feed sources. Insects are considered a suitable protein source for fish, but their fatty acid (FA) composition often does not meet the requirements of aquaculture. In fish oil, PUFAs are dominated by the omega-3 family, and in terrestrial insects, by the omega-6 family. A question arises whether insect larvae lipid composition can be modified to increase the content of omega-3 PUFAs. For this purpose, *Lucilia sericata* larvae were grown on standard feed and feed with addition of camelina oil rich in alpha-linolenic acid (ALA, 18:3n-3), and their FA content and composition were compared. To evaluate the quality of these larvae protein, their amino acid (AA) composition was determined. The FA analysis was performed on a gas chromatograph equipped with a mass-spectrometer detector. The AA analysis was performed on a liquid chromatograph. The AA composition of the examined fly larvae, similarly to other insects (Diptera), was close to the AA composition of fish meal. Fatty

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: ikirill97@gmail.com

ORCID: 0000-0002-6983-771X (Stoyanov K.); 0000-0002-9387-5054 (Makhutova O.); 0000-0001-5587-9807 (Sushchik N.); 0000-0003-4926-1212 (Kolmakova A.); 0000-0003-2276-3095 (Gladyshev M.)

acid composition and content of fly larvae grown on standard food was characterized by a low ratio of omega-3/omega-6 PUFAs and by the dominance of 18:1n-9 and 18:2n-6 fatty acids, which together comprised 40–60 % of the total of FAs. The addition of camelina oil changed the ratio of omega-3/omega-6 PUFAs from 0.11 to 0.46, mainly due to the increase in ALA content. Thus, FA content and composition of *L. sericata* larvae can be significantly modified by a diet.

Keywords: polyunsaturated fatty acids, alpha-linolenic fatty acid, fishmeal, terrestrial insects, fish oil, aquaculture, amino acids.

Acknowledgments. This study was supported by the state assignment within the framework of the Basic Research Program of the Russian Federation (topic no. 51.1.1) and the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation to Siberian Federal University in 2020 (Project no. FSRZ-2020–0006 “Biologically active substances in environmental, biotechnological and medical systems”), and with the financial support of the regional state autonomous institution «Krasnoyarsk Regional Fund of Support of Scientific and Scientific-Technical Activity» within the framework of research and development under the project “Development of import-substituting technologies for salmonid fish aquaculture in the Krasnoyarsk region”.

Citation: Stoyanov K. N., Makhutova O. N., Malyshevsky K. G., Borisova E. V., Sushchik N. N., Kolmakova A. A., Morgun V. N., Gladyshev M. I. Fatty acid content and composition of fly larvae *Lucilia sericata* (family Calliphoridae) grown on diets with different content of polyunsaturated fatty acids and the amino acid composition of this species. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(3), 378–395. DOI: 10.17516/1997-1389-0394



Состав и содержание жирных кислот в личинках мух *Lucilia sericata* (сем. Calliphoridae), выращенных на кормах с разным содержанием полиненасыщенных жирных кислот, и особенности их аминокислотного состава

**К. Н. Стоянов^{а, б}, О. Н. Махутова^{а, б},
К. Г. Малышевский^а, Е. В. Борисова^б, Н. Н. Сущик^{а, б},
А. А. Колмакова^а, В. Н. Моргун^б, М. И. Гладышев^{а, б}**

^аИнститут биофизики
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск
^бСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Аквакультура – быстроразвивающаяся отрасль сельского хозяйства, однако сейчас она столкнулась с недостатком кормов, основу которых составляют уловы дикой рыбы, и, как следствие, повышением их стоимости. Для дальнейшего устойчивого развития

аквакультуры необходимо разработать альтернативные корма, производимые не из дикой рыбы. Насекомые рассматриваются как подходящий источник кормового белка для рыб, однако их жирнокислотный (ЖК) состав часто не соответствует требованиям аквакультуры. В рыбьем жире среди ПНЖК доминируют кислоты семейства омега-3, а в наземных насекомых – семейства омега-6. Исследование возможности модификации ЖК состава личинок насекомых для увеличения содержания омега-3 ПНЖК является актуальной задачей. Целью данной работы было изучить состав и содержание жирных кислот в личинках мухи *Lucilia sericata*, выращенных на стандартном корме и корме с добавлением рыжикового масла, богатым альфа-линоленовой кислотой (АЛК, 18:3n-3), и проанализировать аминокислотный состав (АК) личинок данного вида мух. ЖК анализ проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором. АК анализ выполняли на жидкостном хроматографе. АК состав исследованных личинок мух, как и других насекомых отряда Diptera, был близок к АК составу рыбной муки. Состав и содержание жирных кислот личинок мухи на стандартном корме характеризовались низким соотношением омега-3 / омега-6 ПНЖК и доминированием 18:1n-9 и 18:2n-6 – жирных кислот, которые суммарно составляли от 40 % до 60 % от суммы ЖК. Добавление рыжикового масла изменило соотношение омега-3 / омега-6 ПНЖК с 0,11 до 0,46, главным образом за счёт увеличения содержания АЛК. Таким образом, ЖК состав личинок *L. sericata* может быть существенно модифицирован пищей.

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты, альфа-линоленовая кислота, рыбная мука, рыбий жир, аквакультура, аминокислоты.

Благодарности. Работа поддержана Государственным заданием в рамках программы фундаментальных исследований РФ, тема № 51.1.1; Государственным заданием Министерства образования и науки РФ Сибирскому федеральному университету FSRZ-2020–0006; Краевым государственным автономным учреждением «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках выполнения научных исследований и разработок по проекту «Разработка импортозамещающих технологий для аквакультуры лососевых рыб в условиях Красноярского края».

Цитирование: Стоянов, К.Н. Состав и содержание жирных кислот в личинках мух *Lucilia sericata* (сем. Calliphoridae), выращенных на кормах с разным содержанием полиненасыщенных жирных кислот, и особенности их аминокислотного состава / К.Н. Стоянов, О.Н. Махутова, К.Г. Малышевский, Е.В. Борисова, Н.Н. Сушик, А.А. Колмакова, В.Н. Моргун, М.И. Гладышев // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 378–395. DOI: 10.17516/1997-1389-0394

Введение

Аквакультура – одна из самых быстрорастущих отраслей мирового сельского хозяйства. За последние 50 лет доля продукции аквакультуры на мировом рынке морепродуктов выросла с 4 % до 46 % (FAO, 2020). В противоположность этому добыча дикой рыбы не рас-

тет уже с начала 1990-х годов, поскольку находится на пределе возможностей экосистем (FAO, 2020). Увеличение объема добычи дикой рыбы может привести к катастрофическим последствиям (Worm et al., 2006).

Основу кормов для аквакультуры составляет дикая рыба. В настоящее время аква-

культура потребляет 75 % всего добываемого рыбьего жира (FAO, 2020). Повышение спроса на качественный корм из дикой рыбы для аквакультуры приводит к увеличению стоимости такого корма (Henry et al., 2015). В результате стоимость произведенной рыбы на 40–70 % состоит из стоимости корма (Kroeckel et al., 2012; Henry et al., 2015). Дальнейший рост аквакультуры возможен при условии частичной или полной замены некоторых компонентов корма на наземные организмы равноценного качества (Turchini et al., 2009).

Одним из важнейших компонентов рыбьего корма служат полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) семейства омега-3, а именно докозагексаеновая кислота (ДГК, 22:6n-3) и эйкозапентаеновая кислота (ЭПК, 20:5n-3). Эти ПНЖК необходимы для нормального роста и развития самой рыбы и для обеспечения высокой пищевой ценности рыбы для человека (Turchini et al., 2009; Henry et al., 2015; Tocher, 2015; Махутова, Гладышев, 2020). Омега-3 ПНЖК являются структурными и функциональными элементами мембран клеток, предшественниками эйкозаноидов, а также участвуют в липидном гомеостазе (Carvalho et al., 2018; Махутова, Гладышев, 2020). Их недостаток может приводить к нарушению развития рыб, уменьшению выживаемости и снижению скорости роста (Carvalho et al., 2018; Махутова, Гладышев, 2020). Помимо ЭПК и ДГК рыбам необходима арахидоновая кислота (АРК, 20:4n-6), ПНЖК из семейства омега-6. Она накапливается в отдельных тканях рыб, например, в жабрах и почках у палтуса и в молоках у морского окуня. Отмечено положительное влияние АРК на скорость роста личинок морского окуня (при содержании 1–1,5 % в пище) и на синхронизацию нереста камбалообразных за счёт синтеза эйкозаноидов из этой ПНЖК (Махутова, Гладышев, 2020). Несмотря на то что неко-

торым видам рыб требуется существенное количество АРК, в целом водные организмы богаты ПНЖК семейства омега-3, а наземные – ПНЖК семейства омега-6 (Twining et al., 2016; Colombo et al., 2017). Очевидно, что оптимальной заменой рыбной составляющей в корме будут являться наземные источники, богатые омега-3 ПНЖК, а таковых обнаружено немного. Среди омега-3 ПНЖК в наземных источниках доминирует альфа-линоленовая (АЛК, 18:3n-3), являющаяся предшественником в синтезе ЭПК и ДГК.

Пресноводные виды рыб, в отличие от морских, не утратили способность к синтезу длинноцепочечных ПНЖК семейства омега-3 и омега-6 из их предшественников – АЛК и линолевой кислоты (ЛК, 18:2n-6) соответственно (Carvalho et al., 2018; Gladyshev et al., 2018; Махутова, Гладышев, 2020). Потребности рыб в омега-3 ПНЖК видоспецифичны (St-Hilaire et al., 2007b; Carvalho et al., 2018; Gladyshev et al., 2018; Махутова, Гладышев, 2020). Следовательно, корма для рыб должны подбираться с учетом потребностей вида, а иначе при превышении оптимального уровня наблюдается рассеивание ценных ПНЖК, то есть они либо не усваиваются в полном объеме, либо частично катаболизируются (Gladyshev et al., 2018).

Одним из перспективных, но малоизученных наземных источников омега-3 ПНЖК для аквакультуры являются насекомые. Помимо ПНЖК они богаты аминокислотами, витаминами и минералами и входят в естественный рацион как морских, так и пресноводных рыб (Henry et al., 2015). Кроме того, личинки насекомых способны быстро трансформировать органические отходы в полезную биомассу (Van Huis et al., 2013). Большинство наземных насекомых в естественных условиях не синтезируют и не накапливают ЭПК и ДГК, но могут содержать значитель-

ные количества их предшественника – АЛК, получаемого из пищи (Barroso et al., 2014). Поскольку ЖК состав насекомых отражает ЖК состав пищи, это позволяет достичь повышения содержания необходимых (целевых) ПНЖК в их биомассе (St-Hilaire et al., 2007a, 2007b; Sealey et al., 2011; Barroso et al., 2014, 2017).

Целью данной работы было изучение состава и содержания жирных кислот и аминокислот в личинках мухи *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) – потенциального кормового объекта для рыб, выращенных на кормах с разным содержанием ПНЖК.

Материалы и методы

Эксперименты

Личинки мух, использованные в эксперименте, относились к виду зеленая мясная муха *L. sericata*. Для идентификации имаго были использованы признаки, описанные в (Штакельберг, 1956), а также (Williams, Villet, 2014). Определение подтверждено

А.В. Баркаловым (Институт систематики и экологии животных СО РАН).

Личинки мух *L. sericata* выращивались в экспериментальных условиях от стадии яйца до последней личиночной стадии на двух типах кормовой смеси, состоящей из отходов птицефабрики (контрольный вариант) и отходов птицефабрики с добавлением растительного масла (опытный вариант). Из растительных масел, доступных на рынке в Красноярском крае, было выбрано рыжиковое масло, поскольку оно обладает высоким содержанием АЛК (табл. 1). Рыжиковое масло было предоставлено сотрудниками ФБУ «Красноярский ЦСМ». Исходная популяция мух содержалась при температуре около 20 °С. Питались мухи сахаром с сухим молоком.

Эксперимент с личинками мух проводили в тех же температурных условиях, в которых содержалась исходная популяция. Для эксперимента были использованы яйца мух (одной партии) возрастом 1–2 дня. Яйца были помещены в ящики (40 x 60 см) с кормовой сме-

Таблица 1. Содержание жирных кислот (% ± SE от суммы ЖК) в некоторых растительных маслах (нерафинированных – НР и рафинированных – Р), продаваемых на территории Красноярского края.

Table 1. Fatty acid composition (%± SE of total FA) in some plants oil (unrefined – НР and refined – Р), sold in the Krasnoyarsk Krai.

ЖК	Подсолнечное			Оливковое			Рыжиковое		
	НР		Р	НР		Р	НР		
16:0	6,5 ± 0,2		6,7 ± 0,1	11,5 ± 0,3		11,9 ± 0,8	5,6 ± 0,2		
18:0	4,1 ± 0,3		3,5 ± 0,1	4,1 ± 0,2		3,6 ± 0,2	2,8 ± 0,2		
18:1n-9	21,7 ± 0,7		26,4 ± 1,4	74,1 ± 0,9		64,5 ± 5,1	17,6 ± 1,3		
18:2n-6	64,6 ± 1,4		59,9 ± 1,6	5,8 ± 0,8		15,2 ± 6,2	26,3 ± 5,2		
18:3n-3	1,3 ± 1,2		0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,02		0,6 ± 0,1	25,8 ± 3,8		
20:1n-9	0,1 ± 0,005		0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,009		0,3 ± 0,02	12,1 ± 1,8		
22:1n-9	н.о.		н.о.	н.о.		н.о.	2,6 ± 0,4		
20:2n-6	н.о.		н.о.	н.о.		н.о.	1,7 ± 0,3		
20:3n-3	н.о.		н.о.	н.о.		н.о.	1,2 ± 0,2		
n-6/n-3	778 ± 292		1074 ± 389	10,7 ± 1,2		36,4 ± 22,2	1,3 ± 0,5		

Н.о. – не обнаружено.

сью. Для контрольной и опытной групп личинок мух кормовая смесь состояла из отходов птицефабрики. Дополнительно в кормовую смесь для опытной группы личинок добавляли рыжиковое масло (10 % по массе – 200 г масла на 2 кг корма) при каждом кормлении личинок. Кормление производили два раза в сутки. Эксперимент проводили в пяти повторностях. Продолжительность эксперимента составила 8 дней. На пятый и шестой день личинки из опытной и контрольной групп соответственно прекращали питаться, и их отсаживали в опилки для очистки от остатков корма и опорожнения кишечника.

Исходный корм хранился в замороженном виде. Перед каждым кормлением его размораживали и перемешивали, после чего делили на две равные части (по 2 кг); в одну добавляли рыжиковое масло и перемешивали, вторую оставляли неизменной. Часть кормовой смеси брали для биохимических анализов. Корм в течение часа доставлялся в лабораторию, где его дополнительно измельчали с помощью ручной мясорубки, гомогенизировали и отбирали небольшую порцию для анализа жирных кислот (ЖК).

В яйцах мух перед началом эксперимента и личинках мух после окончания эксперимента были определены влажность, состав и содержание жирных кислот, общее содержание липидов, органического азота и углерода. Пробы для анализа жирных кислот и липидов помещали в смесь хлороформа и метанола (2: 1 по объёму) и хранили при температуре -20°C до дальнейшей обработки. Пробы для измерения влажности, органического азота и углерода взвешивали, высушивали до постоянной массы при температуре 60°C и снова взвешивали. Значения сырой и сухой массы использовались для расчёта влажности. Высушенные пробы хранились в эксикаторе до дальнейшего анализа.

Для анализа аминокислотного состава отбирались личинки из контрольной группы – без добавления рыжикового масла.

Анализ жирных кислот и липидов

Для анализа ЖК использовали навески яиц (0,1–0,2 г), личинок (0,2–0,4 г) и корма (0,6–0,7 г). Перед биохимической обработкой в пробы добавляли фиксированный объем внутреннего стандарта – метиловый эфир нонадекановой кислоты (19:0), растворённый в хлороформе с конечной концентрацией 1 мг/мл. Процедура биохимического анализа проб, включавшая гомогенизацию тканей, экстракцию липидов и приготовление метиловых эфиров жирных кислот подробно описана в работе Christie (2003). Экстракцию и выделение липидной фракции из проб проводили смесью хлороформа и метанола в соотношении 2: 1 по объёму. Пробу помещали в ступку, гомогенизировали и экстрагировали липиды. Полученные экстракты осушали пропусканием через слой безводного Na_2SO_4 . Растворители выпаривали на роторном вакуумном испарителе при температуре 40°C . Затем проводили двухстадийное метилирование ЖК. Для этого в колбу с сухими липидами добавляли 0,7 мл смеси NaOH и метанола (8 г/л) и кипятили на песчаной бане при температуре 90°C в течение 10–12 минут с использованием обратных холодильников. Затем колбы остужали до $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$, добавляли 0,8 мл смеси метанола и H_2SO_4 (33:1 по объёму) и снова кипятили на песчаной бане при температуре 90°C в течение 10 минут. Колбы остужали до $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ и в полученную смесь добавляли двойной объем насыщенного раствора NaCl (3 мл) и 2 мл гексана, смесь интенсивно встряхивали в течение 2–3 мин. После этого метиловые эфиры ЖК были растворены в более лёгкой неполярной фракции – в гексане, а вода с примесями находилась в нижней

части колбы. С помощью делительной воронки неполярная фракция с метиловыми эфирами ЖК была отделена от полярной фракции. Полученные растворы метиловых эфиров ЖК, растворённых в гексане, осушали пропуском через слой безводного Na_2SO_4 . Гексан выпаривали на ротаторном вакуумном испарителе при температуре 40 °С.

Анализ метиловых эфиров ЖК проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором (модель 7890A/7000 QQQ, «Agilent Technologies», США). Условия анализа следующие: несущий газ – гелий, ввод с делением потока, скорость потока газа 1 мл/мин, капиллярная колонка высокой полярности HP-FFAP длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и фазой полиэтиленгликоля, модифицированного нитротерефталевой кислотой толщиной 0,25 μm . Применяли следующий температурный режим: начальная температура 120 °С 3 мин изотермально, подъем от 120 до 180 °С со скоростью 5 °С/мин, затем 10 мин изотермально, второй подъем температуры от 180 до 220 °С со скоростью 3 °С/мин и 5 мин изотермально, затем от 220 до 230 °С со скоростью 10 °С/мин и 20 мин изотермально. Температура ввода (инжектора) 250 °С, температура детектора 180 °С; энергия ионизации детектора 70 эВ, сканирование в диапазоне 45–500 атомных единиц.

Идентификацию пиков жирных кислот осуществляли сравнением полученных масс-спектров с масс-спектрами, имеющимися в базах данных NIST 2008 MS LIB (Revision Jan2010), а также сравнением времен удерживания с таковыми стандартов (U-47885, Sigma, США). Относительное содержание ЖК определяли как отношение площади пика определённой ЖК к сумме площадей всех ЖК. Абсолютное содержание ЖК рассчитывали через площадь пика метилового эфира

19:0, которая соответствовала известному количеству этой ЖК, добавленной перед биохимическими процедурами.

Анализ аминокислотного состава

Анализ аминокислотного состава выполняли на автоматическом анализаторе LA8080 Hitachi методом ВЭЖХ с постколоночной модификацией нингидрином. Подробное описание метода приведено в работах Moore, Stein и Spackman (Moore, Stein, 1954; Spackman et al., 1958). Перед анализом пробы высушивали в сушильном шкафу при температуре 60–65 °С до воздушно-сухого состояния и измельчали. Подготовленные пробы хранили в эксикаторе. Для определения аминокислот в пробе проводили гидролиз в 6 N растворе соляной кислоты. Навеску пробы массой от 3 до 5 мг взвешивали в виале (объем виалы 2 мл), приливали 1–1,5 мл раствора 6 N соляной кислоты. Виалу продували аргоном (для вытеснения воздуха), плотно закручивали крышку и помещали в предварительно нагретую до температуры 110 °С песочную баню на 22 ч. После завершения гидролиза виалы охлаждали до комнатной температуры, взбалтывали и содержимое переносили на беззольный фильтр. Стенки виалы дважды промывали дистиллированной водой. Смывы также переносили на фильтры. Фильтрат выпаривали в выпарительной чашке на кипящей водяной бане до образования мокрого осадка. Затем к осадку добавляли 2 мл дистиллированной воды и снова выпаривали для удаления следов соляной кислоты. Выпаренные образцы хранили в эксикаторе над гранулированной щелочью (NaOH или KOH) до анализа. Перед анализом сухой гидролизат (пробу), содержащий смесь аминокислот, растворяли в буфере из расчета 1 мг исходного белка в 1 мл буфера с рН 2,2. Как правило, пробы

растительного и животного происхождения содержат в своем составе гидрофобные вещества, отравляющие колонку и мешающие разделению. Для освобождения от них использовали картриджи, заполненные слабогидрофобным силикагелем. Через картридж (Диапак С-1) пропускали раствор гидролизата в 5 %-ном растворе диметилсульфоксида в буфере, используемом для разведения проб. Перед анализом пробу фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Для количественной оценки непосредственно перед анализом серии проб в тех же условиях проводили анализ стандартной смеси аминокислот с известной концентрацией (Pickering calibration standart). В результате получали хроматограммы с пиками семнадцати АК: лизин, гистидин, аргинин, треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, пролин, серин, глутаминовая кислота, глицин, аланин, цистин, тирозин. В процессе кислотного гидролиза триптофан практически полностью разрушается, цистеин окисляется в цистин, аспарагин и глутамин превращаются аспарагиновую и глутаминовую кислоты соответственно.

Анализ общего органического углерода и азота

Измерение общего органического углерода и азота в биологических образцах проводили на элементном анализаторе Flash EA 1112 NCSoil/MAS 200 (ThermoQuest, Италия). Калибровочные кривые для элементного анализатора были построены с использованием аспарагиновой кислоты и стандартных эталонных образцов почв (ThermoQuest, Италия).

Содержание белка было пересчитано из данных по азоту с использованием коэффициента 4,76 (Janssen et al., 2017).

Статистический анализ

Расчёт средних, стандартных ошибок, проверка на нормальность (критерий Шапиро – Уилка), дисперсионный анализ, тест Тьюки HSD, Критерий Краскела – Уоллиса, критерий Уилкоксона, *t* – критерий Стьюдента и канонический корреспондентный анализ были выполнены в R версии 3.6.1 (R. Core Team, 2013). Все статистические показатели, не приведённые в таблицах и рисунках, будут предоставлены авторами по запросу.

Результаты

В пробах яиц и личинок мух, а также в их корме было обнаружено более 20 жирных кислот (рис. 1). Во всех пробах среди ЖК доминировали 18:1n-9 и 18:2n-6, которые суммарно составляли от 40 до 60 %.

В корме опытной группы процентное содержание 18:3n-3, 20:1n-9, 20:2n-6, 20:3n-3, 22:1n-9 было достоверно больше, а содержание 16:0, 16:1n-9, 18:0, 18:1n-9 было достоверно меньше, чем в корме контрольной группы личинок.

В личинках опытной группы процентное содержание 16:2n-6, 18:3n-3, 20:1n-9, 20:2n-6, 20:3n-3 было достоверно больше, а 16:1n-9 и 18:2n-6 было достоверно меньше, чем в личинках контрольной группы. При этом процент 18:3n-3 в личинках из опытной группы был в три раза больше, чем в личинках из контрольной группы (рис. 1).

В личинках опытной группы процентное содержание 14:0, суммы изомеров 14:1, 16:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 16:2n-6, 20:5n-3 было достоверно больше, а 18:0, 18:3n-3, 20:1n-9, 20:2n-6, 20:3n-3, 22:1n-9 было достоверно меньше, чем в их корме.

В личинках контрольной группы процентное содержание 14:0, суммы изомеров 14:1, 16:1n-9, 16:1n-7, 16:2n-6, 20:5n-3, было достоверно больше, а содержание 18:0, 20:1n-9,

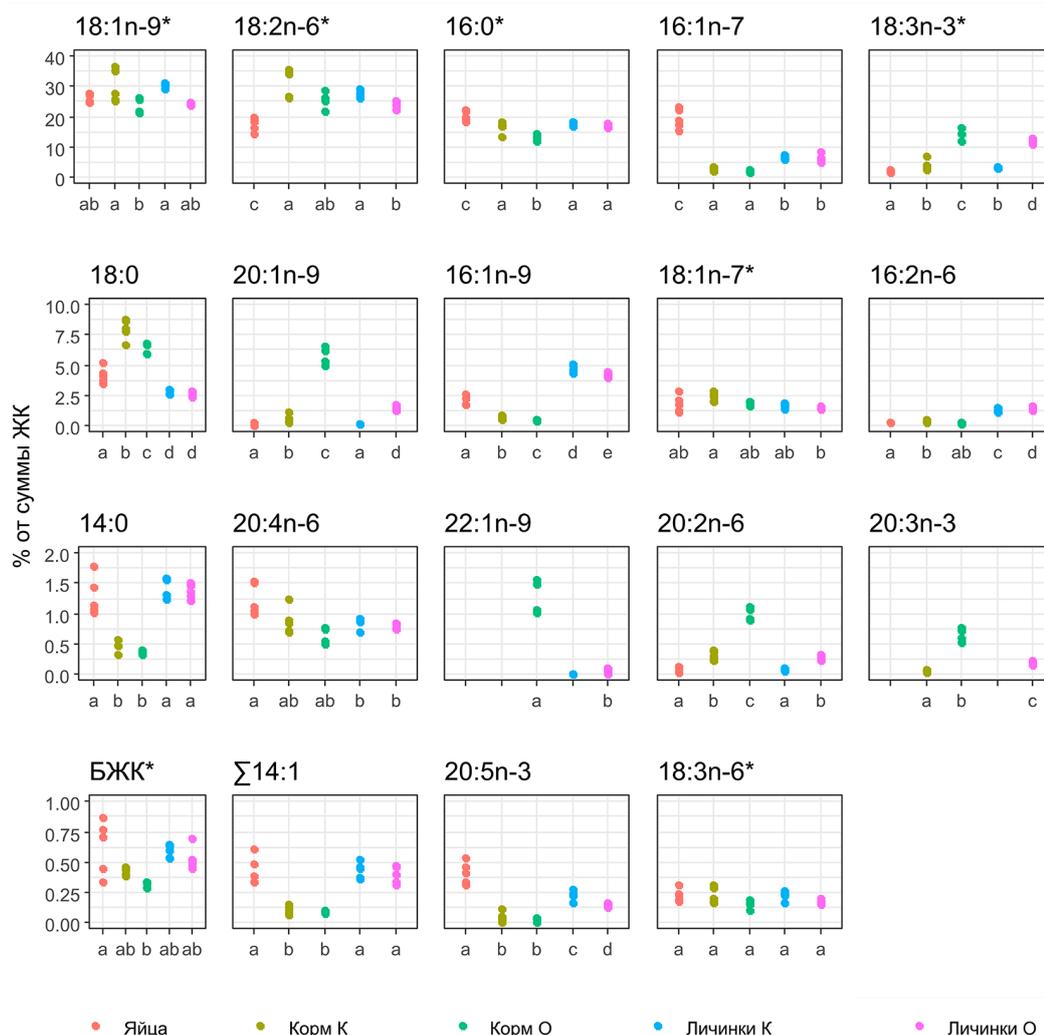


Рис. 1. Содержание жирных кислот (% от суммы ЖК) в пробах яиц, личинок мух контрольной (Личинки К) и опытной групп (Личинки О) и их кормов (Корм К и Корм О соответственно). Массивы данных, обозначенные одинаковыми буквами, достоверно не различались при $p < 0,05$ – тест Тьюки HSD *post hoc* (для данных с нормальным распределением, отмечены звездочкой «*») и критерий Уилкоксона (для данных с ненормальным распределением, отметка отсутствует). БЖК – бактериальные жирные кислоты: 10:0, 11:0, 12:1, i13:0, ai13:0, 13:0.

Fig. 1. Fatty acids content (% of total FA) in samples of eggs (Яйца), fly larvae of control (Личинки К) and experimental group (Личинки О), and their feed (Корм К and Корм О, respectively). Data arrays labeled with the same letter were not significantly different at $p < 0.05$ – Tukey HSD post hoc (data with a normal distribution, marked with an asterisk “*”) and the Pairwise Wilcoxon test (for data with a non-normal distribution, no mark). БЖК are bacterial fatty acids: 10:0, 11:0, 12:1, i13:0, ai13:0, 13:0.

20:2n-6, 20:3n-3 было достоверно меньше, чем в их корме.

В яйцах мух процентное содержание 16:0, 18:0, 16:1n-7 и 20:5n-3 было достоверно больше, чем в личинках, а содержание 16:1n-9,

16:2n-6, 18:2n-6, 18:3n-3 – меньше. Процентное содержание 20:1n-9 и 20:2n-6 в яйцах не отличалось от такового в личинках из контрольной группы, но было достоверно меньше, чем у личинок из опытной группы.

В личинках из опытной группы суммарное абсолютное содержание ЖК (мг/г сырой массы) было достоверно больше, чем в ли-

чинках из контрольной группы (рис. 2). Абсолютное содержание 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6 в личинках из опытной группы было досто-

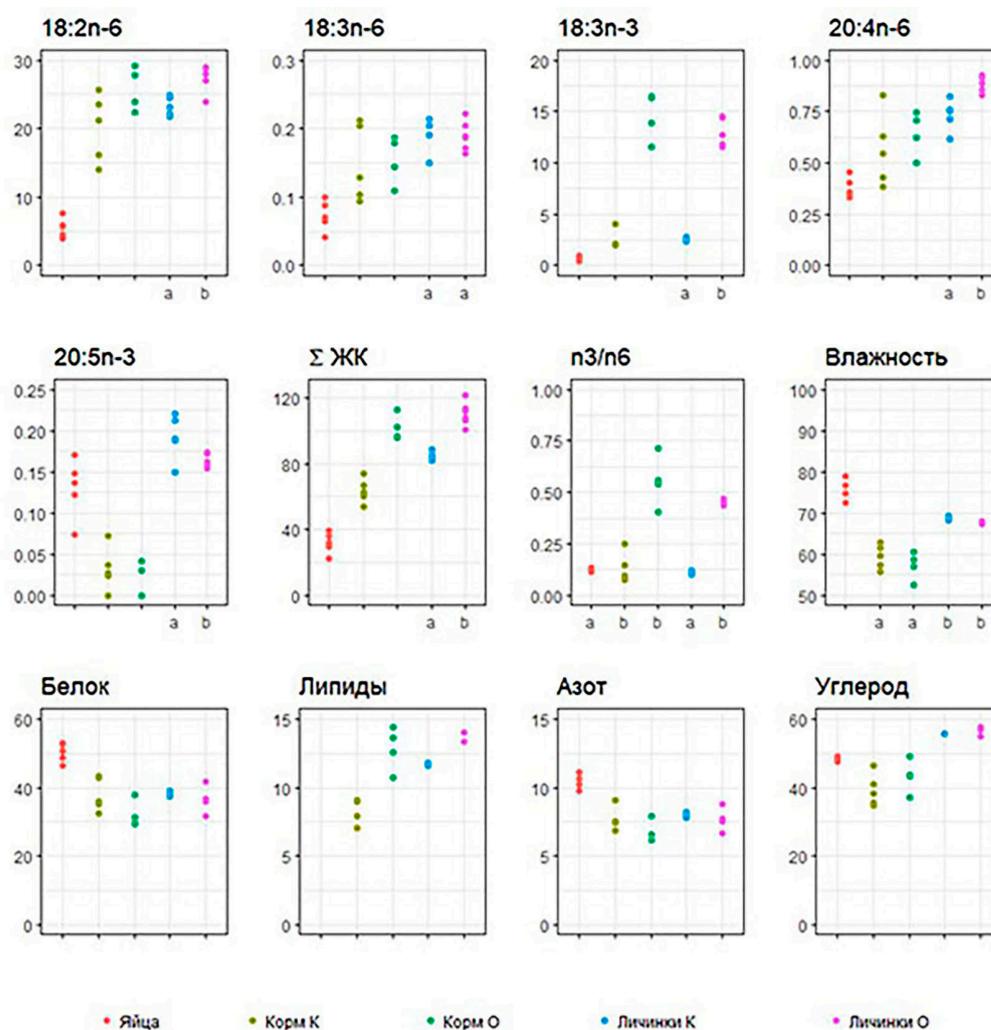


Рис. 2. Концентрация жирных кислот (мг/г сырой массы), соотношение n-3/n-6 жирных кислот, влажность (%), содержание липидов, белка, органического азота и углерода (% от сухой массы) в пробах яиц, личинок мух контрольной (Личинки К) и опытной групп (Личинки О) и их кормов (Корм К и Корм О соответственно). При сравнении средних значений концентрации ЖК (только для личинок) был использован *t*-критерий Стьюдента (все группы, участвовавшие в сравнении, прошли тест на нормальность). Соотношение n-3/n-6 и влажность сравнивали при помощи дисперсионного анализа и теста Тьюки HSD *post hoc*. Данные, обозначенные одинаковыми буквами, достоверно не различались при $p < 0,05$.

Fig. 2. Fatty acid concentration (mg/g wet weight), n-3/n-6 fatty acid ratio, moisture (%), lipid, protein, organic nitrogen and carbon content in samples of eggs (Яйца), fly larvae of control (Личинки К) and experimental groups (Личинки О), and their feed (Корм К and Корм О, respectively). When comparing mean values of FA concentrations (only for larvae), Student's *t*-test was used (all groups in the comparison had normal distribution). The n-3/n-6 ratio and moisture content were compared by ANOVA and post-hoc Tukey's. Data with the same letters were not significantly different at $p < 0.05$.

верно больше, чем в личинках из контрольной группы. При этом содержание 18:2n-6 и 20:4n-6 было больше на 14,8 % и 20,5 % соответственно, а содержание 18:3n-3 – более чем в пять раз.

Канонический корреспондентный анализ содержания ЖК в яйцах, личинках мух и корме представлен в двумерном пространстве согласно процентному содержанию ЖК в пробах (рис. 3). Первая ось (Dim 1) объясня-

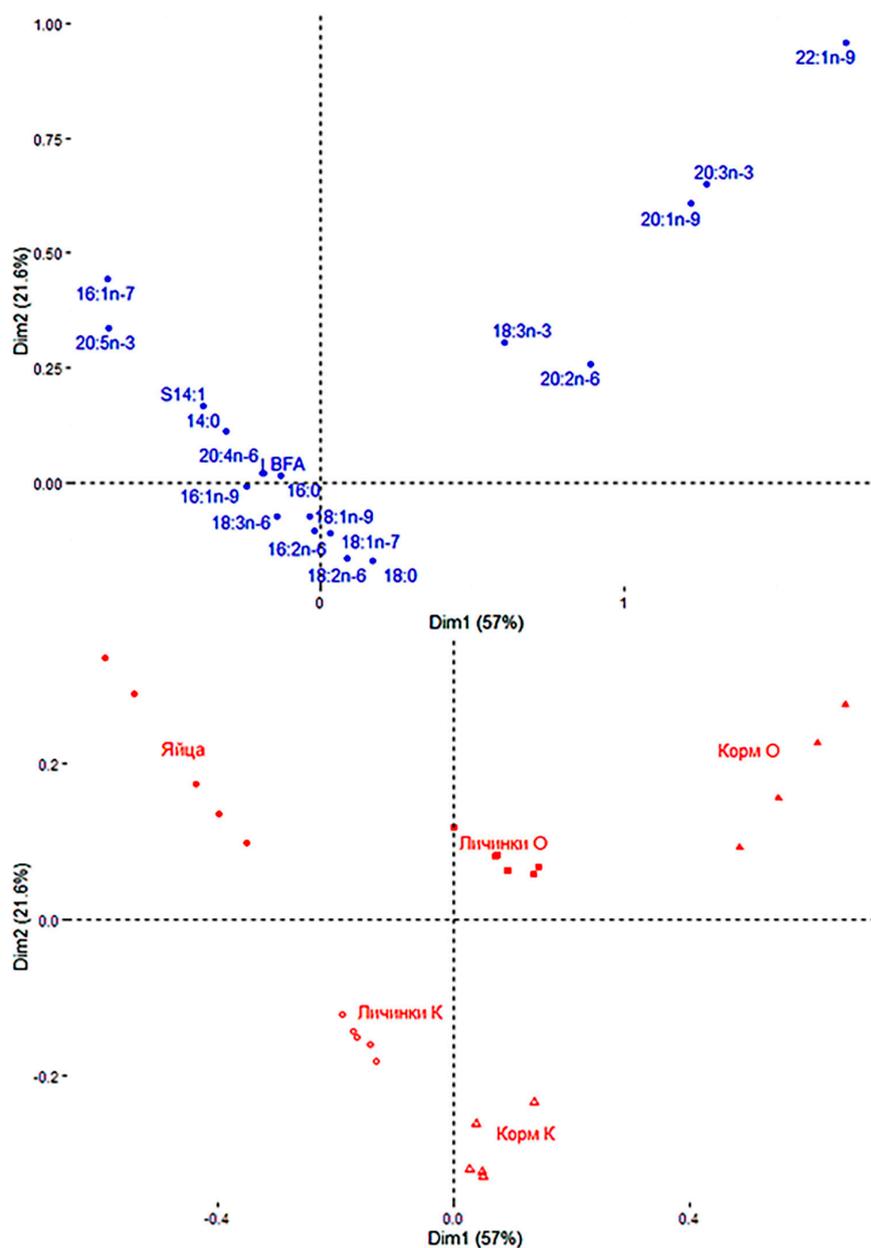


Рис. 3. Результаты канонического корреспондентного анализа процентного содержания жирных кислот в яйцах, личинках и корме (Личинки К и Личинки О – личинки контроль и опыт, Корм К и Корм О – корм контроль и опыт).

Fig. 3. Results of canonical correspondent analysis of percentage of fatty acids in eggs, larvae, and feed (Личинки К and Личинки О – larvae control and experiment, Корм К and Корм О – feed control and experiment).

ла 57 % инерции, вторая ось (Dim 2) – 21,6 %. Первая ось выявила различия между яйцами и кормом опытной группы. Переменные, обеспечивающие основной вклад в различия по первой оси, были 16:1n-7, 20:5n-3 – преобладающие в яйцах и 22:1n-9, 20:3n-3, 20:1n-9 – преобладающие в опытном корме. По второй оси были обнаружены различия между кормом опытной группы и кормом контрольной группы. Основной вклад в данные различия внесли 22:1n-9, 20:3n-3, 20:1n-9, преобладающие в корме опытной группы и 18:2n-6, 18:0, 18:1n-7, 16:2n-6 – преобладающие в корме контрольной группы.

Аминокислотный (АК) состав личинок мух контрольной группы представлен в табл. 2. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты доминировали среди АК, а цистеин и метионин обнаружены в минимальных ко-

личествах. Содержание остальных аминокислот в личинках мух находилось в диапазоне от 3 до 8 %.

Обсуждение

Добавление рыжикового масла в пищу позволило в несколько раз увеличить содержание в личинках АЛК, предшественника в синтезе ЭПК и ДГК. Помимо этого, возросло содержание и других ЖК, которыми богато рыжиковое масло (табл. 1), а именно 20:1n-9, 22:1n-9, 20:2n-6, 20:3n-3. Было обнаружено избирательное накопление ЖК из пищи: среди приведённых выше ЖК АЛК накапливалась сильнее других ЖК, а эруковая кислота (22:1n-9) – слабее.

Обнаруженное избирательное накопление определённых ЖК может помешать или, наоборот, помочь достичь оптимального ЖК

Таблица 2. Аминокислотный состав личинок мух контрольной группы (мг/г сухой массы, % от суммы АК)

Table 2. Amino acid composition of fly larvae of control group (mg/g dry weight, % of total AA)

АК (AA)	мг/г		SE	%		SE
Аланин (Ala)	28,4	±	0,3	6,29	±	0,05
Аргинин (Arg)	23,5	±	0,1	5,21	±	0,09
Аспарагин (Asp)	49,4	±	0,3	10,94	±	0,17
Цистеин (Cys)	3,3	±	0,1	0,72	±	0,02
Глутамин (Glu)	69,8	±	1,3	15,44	±	0,07
Глицин (Gly)	21,6	±	0,2	4,77	±	0,04
Гистидин (His)	16,1	±	0,3	3,57	±	0,03
Изолейцин (Ile)	17,0	±	1,0	3,76	±	0,17
Лейцин (Leu)	31,3	±	0,5	6,92	±	0,01
Лизин (Lys)	32,0	±	0,8	7,07	±	0,08
Метионин (Met)	2,4	±	0,2	0,53	±	0,05
Фенилаланин (Phe)	30,9	±	0,6	6,83	±	0,03
Пролин (Pro)	19,4	±	0,2	4,30	±	0,06
Серин (Ser)	23,5	±	0,5	5,19	±	0,17
Триптофан (Thr)	23,9	±	0,2	5,29	±	0,10
Тирозин (Tyr)	36,4	±	1,0	8,05	±	0,11
Валин (Val)	23,1	±	1,2	5,10	±	0,19

состава личинок насекомых. Однако экспериментальные исследования, оценивающие данный параметр, в доступной литературе отсутствуют. Очевидно, что избирательность накопления пищевых ЖК – видоспецифична, поскольку разные виды насекомых, выращенные на одном субстрате в лабораторных условиях, отличались по ЖК профилям (составу и содержанию ЖК) (Barroso et al., 2014; Ooninx et al., 2020). Известно, что некоторые виды жуков (отряд Coleoptera) богаты ЭПК и ДГК (Raksakantong et al., 2010). Однако эти данные требуют проверки.

Обогащение корма личинок мух маслом, обладающим высоким содержанием АЛК, позволило сместить соотношение омега-3/омега-6 ПНЖК к высоким для наземных экосистем значениям. Подобные результаты были получены Ooninx с коллегами (2020). Личинки, обогащённые АЛК, могут быть перспективным кормом для пресноводных рыб, способных к синтезу ЭПК и ДГК из АЛК (Gladyshev et al., 2018). Добавление в рацион рыб повышенного количества АЛК может дополнительно простимулировать собственный синтез ЭПК и ДГК (Carvalho et al., 2018; Mock et al., 2019). Однако собственного синтеза может оказаться недостаточно для обеспечения высокой пищевой ценности производимой рыбы. Существует большая разница между количеством длинноцепочечных ПНЖК, достаточным для поддержания здоровья и развития рыбы, и количеством необходимым для обеспечения потребностей человека (Tocher, 2015). Некоторые авторы для решения этой задачи предлагают использовать методы селекции и выводить породы рыб с более эффективным синтезом ЭПК и ДГК (Turchini et al., 2011).

Одним из возможных вариантов обогащения целевыми ПНЖК личинок мух является выращивание их на отходах рыбопроизводства (St-Hilaire et al., 2007a; Barroso et al.,

2019). При этом личинок не обязательно кормить рыбными отходами на протяжении всего периода роста. В исследовании на рыбной муке существенное увеличение ЭПК и ДГК наблюдалось при продолжительности кормления личинок около трех часов (Barroso et al., 2017). В других работах было показано увеличение содержания ЭПК и ДГК при кормлении личинок в течение последних суток (St-Hilaire et al., 2007a; Barroso et al., 2019). В работе St-Hilaire с коллегами (2007b) добавление в корм личинок 22 % отходов рыбопроизводства (в течение последних 24 часов) позволило достичь в личинках 1,43 % ЭПК и 1,66 % ДГК. К сожалению, в работе не представлен ЖК профиль кормовой смеси, и выводы об усвояемости ЖК из корма сделать не представляется возможным. В работе Barroso с коллегами (2019) авторы полностью заменили стандартный корм личинок черной львинки на малоценный вид рыбы, содержащий 13,6 % ЭПК и 21,4 % ДГК. При кормлении личинок в течение последних суток содержание ЭПК и ДГК в их телах достигло 3,4 % и 2,7 % соответственно. А при кормлении на протяжении 12 дней содержание ЭПК и ДГК увеличилось до 7,2 % и 4,9 % соответственно. Очевидно, что расход ЭПК и ДГК был малоэффективным и наблюдались существенные потери целевых ПНЖК. Безусловно, малоценные виды рыб больше подойдут для прямого производства рыбных кормов, чем для выращивания личинок с последующим использованием в производстве кормов. Однако такой подход можно использовать при необходимости утилизировать рыбные отходы, так как использование рыбных отходов напрямую для кормления рыб не рекомендуется в связи с высоким риском передачи инфекционных заболеваний (Turchini et al., 2009).

Личинки насекомых с естественным (необогащенным) ЖК профилем использу-

ются как корм для рыб давно и упоминаются в литературе с середины прошлого века (Bondari, Sheppard, 1981). В настоящее время проводятся эксперименты с заменой рыбной муки на муку из личинок насекомых. В основном используются личинки черной львинки (*Hermetia illucens*). В зависимости от вида рыбы процент замены рыбной муки на муку из *H. illucens* варьирует от 17 % до 40 % и в среднем составляет 29 % (Sealey et al., 2011; Kroeckel et al., 2012; Magalhães et al., 2017; Iaconisi et al., 2017, 2018; Hua, 2021). Однако в данных работах рассматривается замена не липидного, а белкового компонента рыбной муки. Успешность замены муки определялась отсутствием негативного влияния на скорость роста рыбы. Потери в питательной ценности рыбы не учитывались. Так, например, для карпа можно достичь замены 100 % рыбной муки без потерь в скорости роста рыбы, однако при этом содержание ЭПК и ДГК в мышцах падает в 2 и 3 раза с 2 % до 0,9 % и с 9,5 % до 2,7 % соответственно (Zhou et al., 2018).

Обогащение личинок ПНЖК может позволить увеличить их долю в рыбьем корме до 50 % от рыбной муки (Sealey et al., 2011). Однако работы с использованием обогащенных личинок насекомых единичны и такой вариант требует дополнительных исследований.

Основной положительный фактор использования личинок насекомых в качестве корма для рыб – их близкий к оптимальному аминокислотный состав (Kroeckel et al., 2012; Barroso et al., 2017). Полученные нами данные по аминокислотному составу личинок *L. sericata* в основном согласуются с данными других авторов, приведёнными в обзорной работе (Kolmakov, Kolmakova, 2020) (рис. 4). Однако, как видно из результатов, личинки исследованных нами мух характеризовались

низким содержанием метионина. Метионин – незаменимая АК, которая наряду с лизином часто выступает в роли лимитирующей (Craig et al., 2017). При использовании личинок *L. sericata* в пище рыб недостаток метионина необходимо возместить.

К дополнительным положительным факторам можно отнести отсутствие негативного влияния корма из личинок насекомых на желудочно-кишечный тракт рыб (Bruni et al., 2018; Li et al., 2020). Тогда как чрезмерное использование растительных добавок, напротив, может нарушить развитие рыбы и нанести вред, спровоцировав воспалительные процессы в желудочно-кишечном тракте (Merrifield et al., 2011; Henry et al., 2015). Помимо этого, включение большого количества растительной пищи может ухудшить вкусовые качества корма (Henry et al., 2015). Кроме того, насекомые содержат естественные фунгициды и антибиотики, что может продлить срок хранения корма из такого сырья (Papatriphon, Soares, 2001; Henry et al., 2015). Производство личинок насекомых может осуществляться круглогодично и требует меньше ресурсов (например, площади земельных участков и потребления воды), в отличие от других вариантов производства белковых и липидных добавок в рыбию корма (Ooninx, de Boer, 2012; Rumpold, Schlüter, 2013).

Заключение

Проведенное экспериментальное исследование показало, что жирнокислотный состав личинки мухи *L. sericata* изменяется в зависимости от состава пищи. Добавление рыжикового масла в корм личинок мух в несколько раз увеличило содержание АЛК и, как следствие, соотношение омега-3/омега-6 ПНЖК. Поскольку жирнокислотный состав личинок поддается модификации, а аминокислотный профиль, за исключением мети-

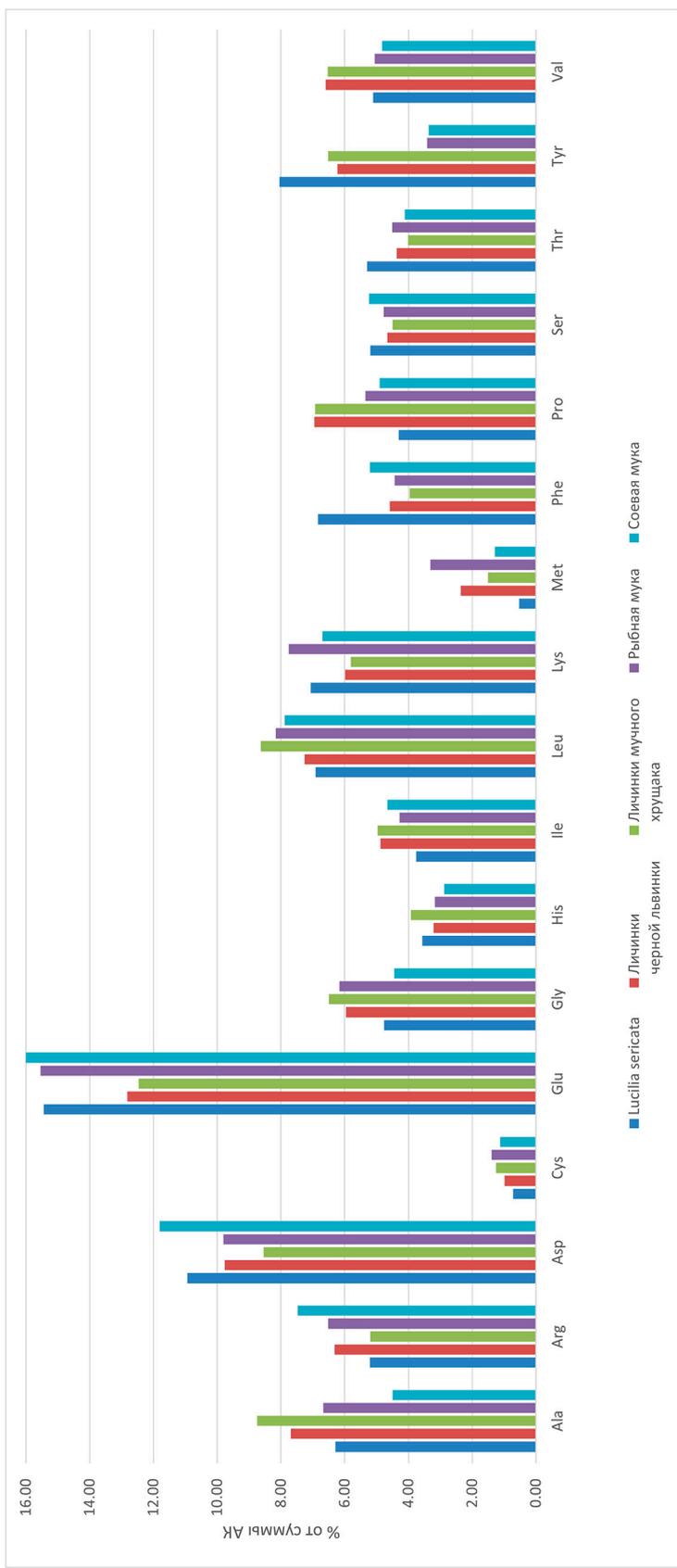


Рис. 4. Сравнение аминокислотного состава насекомых, рыбной и соевой муки. *Lucilia sericata* – изученные нами личинки мух. Личинки черной львинки, личинки мучного хрущака, рыбная и соевая мука – данные из литературного обзора (Kolmakov, Kolmakova, 2020). Названия АК см. табл. 2.

Fig. 4. Comparison of the amino acid composition of insects, fish and soybean meal. *Lucilia sericata* – the fly larvae we examined. Личинка черной львинки – black soldier larvae, Личинка мучного хрущака – mealworm larvae, Рыбная мука – fish meal, and Соевая мука – soy flour (data from the review (Kolmakov, Kolmakova, 2020)).

онина, соответствует оптимальным параметрам, мы полагаем, что личинки *L. sericata* могут быть рекомендованы для включения в рацион экспериментальных аквакультурных рыб при разработке рыбных кормов с частичной заменой рыбной муки.

Список литературы / References

Махутова О. Н., Гладышев М. И. (2020) Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты в физиологии и метаболизме рыб и человека: значение, потребности, источники. *Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова*, 106(5): 601–621 [Makhutova O. N., Gladyshev M. I. (2020) Essential PUFA in physiology and metabolism of fish and human: functions, needs, sources. *Russian Journal of Physiology* [Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I. M. Sechenova], 106(5): 601–621 (in Russian)]

Штакельберг А. А. (1956) *Синантропные двукрылые фауны СССР*. Москва, Ленинград, Издательство АН СССР, 164 с. [Stackelberg A. A. (1956) *Synanthropic Diptera in the Fauna of the USSR*. Moscow, Leningrad, Academy of Sciences of USSR, 164 p. (in Russian)]

Barroso F. G., de Haro C., Sánchez-Muros M.-J., Venegas E., Martínez-Sánchez A., Pérez-Bañón C. (2014) The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, 422–423: 193–201

Barroso F. G., Sánchez-Muros M.-J., Segura M., Morote E., Torres A., Ramos R., Guil J.-L. (2017) Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62: 8–13

Barroso F. G., Sánchez-Muros M. J., Rincón M. Á., Rodríguez-Rodríguez M., Fabrikov D., Morote E., Guil-Guerrero J. L. (2019) Production of n-3-rich insects by bioaccumulation of fishery waste. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82: 103237

Bondari K., Sheppard D. C. (1981) Soldier fly larvae as feed in commercial fish production. *Aquaculture*, 24: 103–109

Bruni L., Pastorelli R., Viti C., Gasco L., Parisi G. (2018) Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. *Aquaculture*, 487: 56–63

Carvalho M., Peres H., Saleh R., Fontanillas R., Rosenlund G., Oliva-Teles A., Izquierdo M. (2018) Dietary requirement for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for fast growth of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fingerlings. *Aquaculture*, 488: 105–113

Christie W. W. (2003) *Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids*. Bridgwater, Oily Press, 416 p.

Colombo S. M., Wacker A., Parrish C. C., Kainz M. J., Arts M. T. (2017) A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and within marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews*, 25(2): 163–174

Craig S., Helfrich L. A., Kuhn D., Schwarz M. H. (2017) *Understanding fish nutrition, feeds, and feeding*. Virginia Cooperative Extension

FAO (2020) *The state of world fisheries and aquaculture 2020*. FAO

Gladyshev M. I., Glushchenko L. A., Makhutova O. N., Rudchenko A. E., Shulepina S. P., Dubovskaya O. P., Zuev I. V., Kolmakov V. I., Sushchik N. N. (2018) Comparative analysis of content of omega-3 polyunsaturated fatty acids in food and muscle tissue of fish from aquaculture and natural habitats. *Contemporary Problems of Ecology*, 11(3): 297–308

Henry M., Gasco L., Piccolo G., Fountoulaki E. (2015) Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203(1): 1–22

Hua K. (2021) A meta-analysis of the effects of replacing fish meals with insect meals on growth performance of fish. *Aquaculture*, 530: 735732

Iaconisi V., Bonelli A., Pupino R., Gai F., Parisi G. (2018) Mealworm as dietary protein source for rainbow trout: Body and fillet quality traits. *Aquaculture*, 484: 197–204

Iaconisi V., Marono S., Parisi G., Gasco L., Genovese L., Maricchiolo G., Bovera F., Piccolo G. (2017) Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* larvae meal: Effects on growth performance and final quality traits of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture*, 476: 49–58

Janssen R.H., Vincken J.-P., van den Broek L.A.M., Fogliano V., Lakemond C.M.M. (2017) Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11): 2275–2278

Kolmakov V.I., Kolmakova A.A. (2020) Amino acids in prospective feeds for fish aquaculture: a review of experimental data. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 13(4): 424–442 (in Russian)

Kroeckel S., Harjes A.-G.E., Roth I., Katz H., Wuertz S., Susenbeth A., Schulz C. (2012) When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute – growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 364–365: 345–352

Li Y., Kortner T.M., Chikwati E.M., Belghit I., Lock E.-J., Krogdahl Å. (2020) Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 520: 734967

Magalhães R., Sánchez-López A., Leal R.S., Martínez-Llorens S., Oliva-Teles A., Peres H. (2017) Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 476: 79–85

Merrifield D.L., Olsen R.E., Myklebust R., Ringo E. (2011) Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish. *Soybean and Nutrition*. El-Shemy H. (ed.) IntechOpen, p. 231–250

Mock T.S., Francis D.S., Jago M.K., Glencross B.D., Smullen R.P., Keast R.S.J., Turchini G.M. (2019) Altered levels of shorter vs long-chain omega-3 fatty acids in commercial diets for market-sized Atlantic salmon reared in seawater – effects on fatty acid composition, metabolism and product quality. *Aquaculture*, 499: 167–177

Moore S., Stein W.H. (1954) A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 211(2): 907–913

Ooninx D.G.A.B., de Boer I.J.M. (2012) Environmental impact of the production of Mealworms as a protein source for humans – a life cycle assessment. *PLoS ONE*, 7(12): e51145

Ooninx D.G.A.B., Laurent S., Veenenbos M.E., van Loon J.J.A. (2020) Dietary enrichment of edible insects with omega 3 fatty acids. *Insect Science*, 27(3): 500–509

Papatryphon E., Soares J.H. Jr. (2001) Optimizing the levels of feeding stimulants for use in high-fish meal and plant feedstuff-based diets for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, 202(3–4): 279–288

R. Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria

- Raksakantong P., Meeso N., Kubola J., Siriamornpun S. (2010) Fatty acids and proximate composition of eight Thai edible terricolous insects. *Food Research International*, 43(1): 350–355
- Rumpold B. A., Schlüter O. K. (2013) Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17: 1–11
- Sealey W. M., Gaylord T. G., Barrows F. T., Tomberlin J. K., McGuire M. A., Ross C., St-Hilaire S. (2011) Sensory analysis of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed enriched Black soldier fly prepupae, *Hermetia illucens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(1): 34–45
- Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958) Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*, 30(7): 1190–1206
- St-Hilaire S., Cranfill K., McGuire M. A., Mosley E. E., Tomberlin J. K., Newton L., Sealey W., Sheppard C., Irving S. (2007a) Fish offal recycling by the Black soldier fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2): 309–313
- St-Hilaire S., Sheppard C., Tomberlin J. K., Irving S., Newton L., McGuire M. A., Mosley E. E., Hardy R. W., Sealey W. (2007b) Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(1): 59–67
- Tocher D. R. (2015) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture*, 449: 94–107
- Turchini G. M., Francis D. S., Keast R. S. J., Sinclair A. J. (2011) Transforming salmonid aquaculture from a consumer to a producer of long chain omega-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 124(2): 609–614
- Turchini G. M., Torstensen B. E., Ng W.-K. (2009) Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1): 10–57
- Twining C. W., Brenna J. T., Hairston N. G. Jr., Flecker A. S. (2016) Highly unsaturated fatty acids in nature: what we know and what we need to learn. *Oikos*, 125(6): 749–760
- Van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., Vantomme P. (2013) *Edible insects: future prospects for food and feed security*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Williams K. A., Villet M. H. (2014) Morphological identification of *Lucilia sericata*, *Lucilia cuprina* and their hybrids (Diptera, Calliphoridae). *ZooKeys*, 420: 69–85
- Worm B., Barbier E. B., Beaumont N., Duffy J. E., Folke C., Halpern B. S., Jackson J. B. C., Lotze H. K., Micheli F., Palumbi S. R., Sala E., Selkoe K. A., Stachowicz J. J., Watson R. (2006) Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science*, 314(5800): 787–790
- Zhou J. S., Liu S. S., Ji H., Yu H. B. (2018) Effect of replacing dietary fish meal with black soldier fly larvae meal on growth and fatty acid composition of Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, 24(1): 424–433

DOI 10.17516/1997-1389-0395

EDN: URBUBN

УДК 579.61

Analysis of the Microbiome of Human Lungs and Respiratory System in Lung Disorders: a Review

**Vladislav Yu. Buslaev^{a*}, Lyudmila V. Matskova^b,
Varvara I. Minina^{a, c} and Vladimir G. Druzhinin^c**

*^aFederal Research Centre of Coal and Coal Chemistry SB RAS
Institute of Human Ecology
Kemerovo, Russian Federation*

*^bImmanuel Kant Baltic Federal University
Kaliningrad, Russian Federation*

*^cKemerovo State University
Kemerovo, Russian Federation*

Received 22.12.2020, received in revised form 29.01.2021, accepted 25.04.2021

Abstract. The structural stability of the respiratory system and the functional activity of the lungs are influenced by the local microflora. The initiation and the progression of some lung diseases are determined by pathogenic factors produced by the lung microbiota and the dysbiotic conditions in general. Metagenomic studies based on sequencing of the genes for 16S ribosomal RNA have been used to collect direct data on the composition of the lung microbiota. 16S rRNA genes consist of 9 variable regions (V1-V9). By determining highly conservative 16S rRNA regions, bacterial genomes can be assigned to higher-level taxa, while based on information about less conservative regions of these genes, the genera or species of bacteria can be identified. Metatranscriptomics, which is based on estimating the number of copies of transcripts from the pulmonary microbiota, is also rapidly developing. The diversity and redundancy of genes and their variable activity in different conditions are prerequisites for using high-performance technologies such as RNA-seq and parallel sequencing methods. The metatranscriptomic analysis data significantly complement metagenomics; at the same time, metatranscriptomics is assumed to be more informative in examination of functional interactions between microbiome and host organism. These approaches offer an estimation of the biological activity of different components in the microbiome under normal and pathological conditions. This review

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: vladislasbus2358@yandex.ru

ORCID: 0000-0001-5566-5323 (Buslaev V.); 0000-0002-3174-1560 (Matskova L.); 0000-0003-3485-9123 (Minina V.); 0000-0002-5534-2062 (Druzhinin V.)

summarizes the results of recent metagenomic and metatranscriptomic studies regarding a number of serious diseases of the respiratory system (lung cancer, chronic obstructive lung disease, asthma, and cystic fibrosis).

Keywords: metagenomics, 16S rRNA sequencing, metatranscriptomics, RNA-seq, COPD, lung cancer, cystic fibrosis, asthma.

Acknowledgements. The research was supported by RFBR and Kemerovo region within scientific project No. 20–44–420012 p_a.

Citation: Buslaev V. Yu., Matskova L. V., Minina V. I., Druzhinin V. G. Analysis of the microbiome of human lungs and respiratory system in lung disorders: a review. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2022, 15(3), 396–421. DOI: 10.17516/1997-1389-0395



Анализ микробиоты лёгких и респираторного тракта человека при заболеваниях легочной системы (обзор)

**В. Ю. Буслаев^а, Л. В. Мацкова^б,
В. И. Минина^{а, в}, В. Г. Дружинин^в**

*^аФедеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН
Институт экологии человека
Российская Федерация, Кемерово*

*^бБалтийский федеральный университет имени Канта
Российская Федерация, Калининград*

*^вКемеровский государственный университет
Российская Федерация, Кемерово*

Аннотация. Микробиота легочной системы способна оказывать значимое влияние на стабильность структуры и функциональную активность легких. Инициация и прогрессирование некоторых заболеваний легких зависит от патогенных факторов, экспрессируемых легочной микробиотой, и состояния дисбиоза в целом. Метагеномные исследования, основанные на секвенировании генов 16S рРНК, позволили получить актуальные данные о составе легочной микробиоты. Гены 16S рРНК состоят из 9 переменных участков (V1–V9). Определение более консервативных в эволюционном плане участков последовательностей 16S рРНК гена позволяет относить исследуемые геномы бактерий к таксонам более высокого порядка, в то время как получение информации о менее консервативных участках позволяет определять принадлежность бактерий к роду или виду. В настоящее время также активно развивается метатранскриптомика, основанная на оценке числа копий транскриптов легочной микробиоты. Существование разнообразия и избыточности генов, а также изменчивость их активности в разных условиях предполагает использование таких высокопроизводительных

технологий, как секвенирование РНК и методы параллельного секвенирования. Полученные данные по метатранскриптомному анализу в значительной степени дополняют результаты метагеномных исследований, в то же время предполагается, что метатранскриптомный подход более информативен, что касается исследований функциональных взаимодействий между микробиотой и организмом-хозяином. Эти подходы предполагают оценку биологической активности различных компонентов микробиома в норме и патологии. В обзоре рассмотрены методические особенности применения метагеномного анализа, а также метатранскриптомных исследований при некоторых тяжелых заболеваниях легочной системы (рак легкого, хроническая обструктивная болезнь легких, астма и муковисцидоз).

Ключевые слова: метагеномика, секвенирование 16S рРНК, метатранскриптомика, РНК-секвенирование, хроническая обструктивная болезнь лёгких, рак лёгкого, муковисцидоз, астма.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Кемеровской области в рамках научного проекта № 20–44–420012 р_а.

Цитирование: Буслаев, В.Ю. Анализ микробиоты лёгких и респираторного тракта человека при заболеваниях легочной системы (обзор) / В.Ю. Буслаев, Л.В. Мацкова, В.И. Минина, В.Г. Дружинин // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 396–421. DOI: 10.17516/1997-1389-0395

Введение

Микробиота человека представляет собой совокупность микроорганизмов (бактерий, вирусов и грибов), населяющих определенную часть организма. Таким образом, человек может рассматриваться как метаорганизм. Совокупность всех генов микроорганизмов обозначают термином «микробиом». Компоненты микробиоты лёгких имеют генотоксический, иммуномодуляторный и дисбиотический потенциалы, вклад которых (в совокупности с другими факторами) увеличивает предрасположенность к раку лёгкого, заболеванию, вызывающему самую высокую смертность среди онкологических патологий (Barta et al., 2019; Maddi et al., 2019). Активность отдельных составляющих микробиоты (бактерий, вирусов и грибов), населяющих мукозальный слой респираторного тракта, оказывает влияние на тяжесть течения наследственных заболеваний, напри-

мер муковисцидоза. Интересно, что не только патогенная, но и комменсальная микробиота может запускать процесс модуляции иммунных реакций, провоцировать аномальный иммунологический ответ и развитие таких заболеваний легочной системы, как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и астма (Wang et al., 2017). Патологические реакции иммунитета, как правило, связаны с развитием острого воспаления (рис. 1). Представители определенных бактериальных родов были отнесены к индукторам воспалительных реакций и могут рассматриваться в качестве факторов развития предопухольных процессов.

Секвенирование генов, кодирующих РНК малой субъединицы рибосом бактерий, в настоящее время является наиболее реализуемым и информативным методом для изучения разнообразия бактерий в результате широкого использования технологий нового



Рис. 1. Развитие воспалительных реакций при участии компонентов микробиоты человека. Синтез факторов воспаления связан с первоначальным этапом распознавания компонентов бактериальной мембраны (Pathogen Associated Molecular Patterns, РАМР's) Toll-подобными рецепторами клеток организма-хозяина. Развитие острого воспаления является ключевым моментом в инициации онкогенеза с участием бактериальной микробиоты

Fig. 1. Development of inflammatory reactions involving human microbiota. Synthesis of inflammatory factors is related to primary recognition of bacterial membrane components (Pathogen Associated Molecular Patterns, РАМР's) by Toll-like receptors of host organism cells. Acute inflammation development is a key factor for oncogenesis initiation by bacterial microbiota

поколения. Для определения последовательностей выбранные участки генов 16S рНК амплифицируются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Следующим этапом является создание библиотеки бактериальных последовательностей с идентификационными баркодами. С этой целью полученные продукты предыдущей стадии амплифицируют в ПЦР ещё раз с праймерами, содержащими баркоды. Результаты прочтений объединяются в ходе биоинформатической обработки результатов секвенирования в операционные таксономические единицы (OTU's) для последующей таксономической аннотации.

Кластерирование нуклеотидных последовательностей и построение OTU's обеспечи-

вается методами биоинформатики (Корюлова et al., 2016). К наиболее широко применяемым программам относятся uclust, USEARCH, UPARSE и CD-HIT. Таксономическая классификация нуклеотидных последовательностей эффективно осуществляется с помощью реализации алгоритма Kraken (Wood, Salzberg, 2014). Пакет программ PathoScore обеспечивает более продуктивный анализ наличия патогенов, ассоциированных с муковисцидозом, при сопоставлении с ресурсами программ Kraken и MetaPhlAn (Hahn et al., 2018). Аннотация основана на сравнении нуклеотидных последовательностей с референсными базами данных (базами данных последовательностей генов 16S рНК).

К наиболее распространенным базам данных в исследованиях микробиома относятся SILVA и Greengenes, которые содержат большое разнообразие прокариотических последовательностей. SILVA состоит из более чем четырех миллионов последовательностей РНК малых и 400 тысяч последовательностей РНК больших субъединиц рибосом архей и эукариот. База данных Greengenes позволяет определять таксономию бактерий и архей, основываясь на филогенетических деревьях, построенных на основе многократно выверенных, искусственных (нехимерных) последовательностей, но, к сожалению, она не обновлялась с мая 2013 года. Используется также база данных Ribosomal Data Project, которая позволяет осуществлять выравнивание последовательностей рРНК для построения более подробных филогенетических деревьев.

Однако существуют некоторые сложности и ограничения в применении метагеномики. Например, качество полученных в резуль-

тате секвенирования прочтений определяется особенностями дизайна праймеров и оптимизацией протокола выделения бактериальной ДНК. Кроме того, сложность биоинформатического анализа состоит в распознавании химерных и целевых прочтений, а также последовательностей праймеров. Ошибки секвенирования могут обуславливать возникновение ложноположительных результатов при анализе структуры микробиома. В качестве главного ограничения метагеномных исследований выступает вариабельность числа копий генов 16S рРНК в различных бактериальных геномах (Větrovský, Baldrian, 2013).

Метагеномный и метатранскриптомный анализы в настоящее время выступают в качестве основных молекулярных методов изучения микробиоты человека (рис. 2). Метатранскриптомика представляет собой альтернативный подход к исследованию структуры микробиома и определению его функциональной значимости. В первую



Рис. 2. Сравнительная характеристика методов метагеномики и метатранскриптомики. На схеме приведены основные этапы анализа микробиоты с применением двух разных подходов

Fig. 2. Comparative characteristics of metagenomics and metatranscriptomics methods. The diagram shows the main stages of microbiota analysis using two different approaches

очередь данный метод направлен на анализ экспрессии генов микроорганизмов и эффективен при определении полного транскриптомного профиля микробиома. Секвенирование РНК (RNA-seq) обеспечивает более эффективное и подробное исследование транскриптома, в особенности при выявлении наиболее активно экспрессирующихся генов в составе бактериальных сообществ. Данные группы генов могут выступать в качестве маркеров присутствия специфических компонентов микробиома в определенных условиях. RNA-seq позволяет также идентифицировать пути метаболизма, которые используются микроорганизмами, что способствует более полному пониманию их влияния на развитие определенных патологических состояний.

Анализ транскриптов микробных генов позволил получить более подробную картину при исследовании физиологического состояния здорового организма и развития заболеваний человека. Например, метатранскриптомный анализ выявил взаимосвязь между изменением состава микробиоты ротовой полости и развитием периодонтита (Jorth et al., 2014). Было отмечено, что в данном случае микробиота гораздо менее разнообразна, бактерии *Fusobacterium nucleatum* увеличивают уровень экспрессии генов, задействованных в синтезе бутирата при развитии заболевания. Интеграция метагеномного, метатранскриптомного и виромного подходов позволяет провести более точный и корректный анализ (Vikel et al., 2015). Именно интегративное исследование позволило получить представление о большом разнообразии кишечного микробиома человека и о взаимосвязанной экспрессии генов организма-хозяина и микробиоты, его населяющей, а также о том, что особенности метагенома влияют на структуру метатранскриптома (Franzosa et al., 2014).

На примере исследования транскриптома микробиоты была представлена система прямого секвенирования РНК молекул с использованием Oxford Nanopore sequencing system. Nanopore секвенирование основано на последовательном распознавании отдельных нуклеотидов в составе полинуклеотидной цепи, которые проходят через нанопоровые структуры (Cozzuto et al., 2020). Данный подход может быть применим при метатранскриптомных исследованиях для обеспечения экономически рентабельного и точного анализа биологических систем (Semmourri et al., 2020). Была продемонстрирована возможность детекции последовательностей эндопаразитов и других редких видов, основанной на анализе транскриптов 18S рРНК. Большое разнообразие нуклеотидных последовательностей, аннотированных из ONT и GO баз данных, необходимо для идентификации генов, вовлеченных в процессы гликолиза и синтеза белка.

Материал репозитория нуклеотидных последовательностей прокариот также выступает в качестве стандарта для сопоставления результатов RNA-seq с помощью алгоритмов выравнивания. Вместе с наличием референсных баз существует разнообразие биоинформатических программ, которые были разработаны для интерпретации результатов RNA-seq анализа в метатранскриптомных исследованиях. В ходе анализа используются алгоритмы: HUMAnN 2 (Franzosa et al., 2018), SAMSA (Westreich et al., 2016), SAMSA2 (Westreich et al., 2018), MetaTrans (Martinez et al., 2016), mOTU's program (Heintz-Buschart et al., 2016; Milanese et al., 2019).

Ограничения метатранскриптомного анализа связаны с тем, что в процессе выделения тотальной РНК наибольшей концентрацией обладают молекулы рРНК, и это может негативным образом влиять на возможность выделять мРНК. мРНК молекулы,

которые являются основной целью RNA-seq подхода, довольно нестабильны. Последовательное разрушение их структуры является запрограммированным и энергетически структурированным клеточным процессом, катализируемым специфическими рибонуклеазами (экзо- или эндонуклеазы). Процесс может быть сопряжен с транскрипцией. Контроль стабильности мРНК является адаптивным механизмом при регуляции экспрессии генов. Концентрация мРНК может влиять на деградацию данной структуры (Nouaille et al., 2017). Было разработано определенное количество методов для измерения периода деградации мРНК (Lugowski et al., 2018). Расчёт оптимальных показателей концентрации, размера молекул и удаление рРНК предотвращает деградацию мРНК. Это следует учитывать в ходе обработки данных.

Цель исследования: обобщение данных об опыте использования метагеномного и метатранскриптомного анализа микробиома при заболеваниях легочной системы.

Материалы и методы

Поиск был выполнен с использованием электронных баз данных, включая MedLine, PubMed, TOXLINE и Web of Science. Описанные данные являются результатом поиска и использования литературных источников, опубликованных до сентября 2020 года.

Были использованы ключевые слова и термины, необходимые для поиска: метатранскриптомика, метагеномные исследования, бактериальный транскриптом, секвенирование 16S рРНК, секвенирование РНК (RNA-seq), легочные заболевания, хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), рак лёгкого (РЛ), муковисцидоз, астма. Были включены исследования, полный текст которых был опубликован на английском или русском языках.

Из анализа были исключены публикации, направленные на рассмотрение общих вопросов молекулярных, генетических и цитогенетических основ развития легочных заболеваний. В данной работе основное внимание уделялось исследованиям микробиома путем метагеномного и метатранскриптомного анализа при таких легочных заболеваниях, как рак лёгкого (РЛ), хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), муковисцидоз и астма. 13 научных работ были посвящены исследованию ХОБЛ, 14 научных публикаций содержали информацию о вкладе микробиома в развитие РЛ, 7 работ были посвящены изучению муковисцидоза и 12 – астме. В обсуждение была включена информация о молекулярных методах и биоинформатическом анализе, которые могут быть применены в метагеномном и метатранскриптомном подходе. Были также описаны возможные риски и ограничения, связанные с применением двух видов анализа.

Применение метагеномных и метатранскриптомных исследований в изучении болезней легочной системы

Легочные заболевания относятся к патологиям, которые обуславливают высокие показатели заболеваемости и смертности среди населения. Их развитие может быть сопряжено с активностью микробиоты легочной системы (рис. 3). Применение высокопроизводительных технологий секвенирования позволяет проводить характеристику нормального микробиомного профиля разных отделов дыхательной системы человека. Согласно результатам исследований, проведенных несколькими независимыми научными группами, микробиота лёгких характеризуется высокой степенью филогенетического разнообразия (Kovaleva et al., 2019). *Bacteroidetes* и *Firmicutes* являются преобладающими ти-

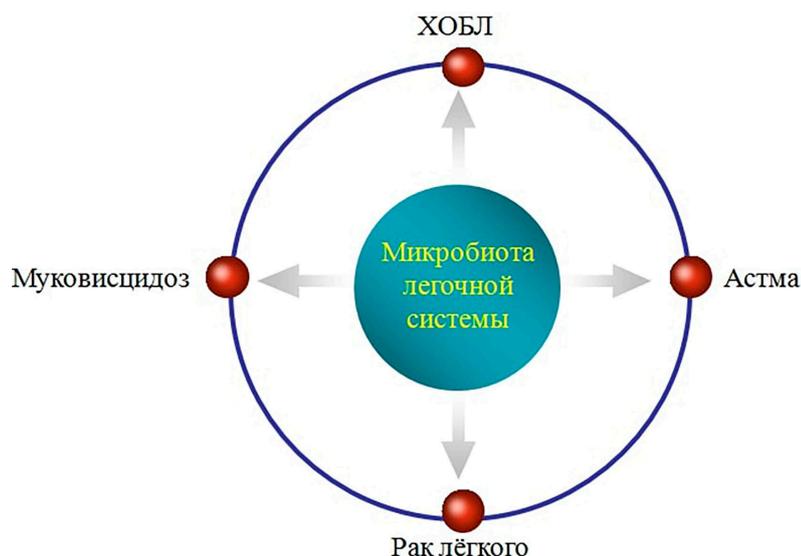


Рис. 3. Развитие патологий легочной системы под действием микробиоты

Fig. 3. Development of lung system pathologies caused by microbiota

пами бактерий в составе лёгких (Segal, Blaser, 2014). Для нормальной микробиоты лёгких также характерно наличие бактериальных родов *Prevotella* и *Veillonella*. Анализ бактериальных генов 16S рРНК при использовании Oxford Nanopore MiniION секвенирования и прокариотических баз данных MegaBLAST и EZ BioCloud позволил идентифицировать основные таксоны, обитающие в респираторном тракте человека (Ibironke et al., 2020). В качестве основных доминирующих бактериальных типов были определены *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Fusobacteria*. Видовая структура была представлена в основном таксонами *Veillonella dispar*, *Veillonella atypia*, *Streptococcus infantis* и *Streptococcus mitis*. Было отмечено, что около 95 % бактериальных таксонов, обнаруженных в респираторном тракте, могли мигрировать из других отделов легочной системы.

Муковисцидоз

Муковисцидоз поражает респираторный тракт и снижает дыхательную функцию лёг-

ких. Заболевание относится к наследственным, аутосомно-рецессивным моногенным патологиям, связанным с наличием мутаций в гене *CFTR*. Данный ген кодирует белок – трансмембранный регулятор проводимости, нарушение его активности способствует сгущению секретов желез внутренней секреции, что создаёт условия для активного размножения определенных бактерий. Патогенез муковисцидоза неразрывно связан с активностью компонентов микробиоты (бактерий, вирусов и грибов), населяющих мукозальный слой респираторного тракта. С применением методов секвенирования нового поколения была составлена подробная характеристика состава легочной микробиоты у пациентов с наличием муковисцидоза (Frost et al., 2020).

Одним из видов осложнений муковисцидоза является хронический синусит. В развитие подобных состояний потенциальный вклад могут вносить сообщества микроорганизмов микробиоты верхних и нижних дыхательных путей. Свойства микробиоты респираторного тракта были оценены у боль-

ных муковисцидозом, которые получали лечение от хронического синусита (Lucas et al., 2018). В ходе данной работы был сопоставлен уровень бактериального разнообразия, а также особенности состава микробиоты разных отделов легочной системы. Степень разнообразия микроорганизмов была выше в составе верхних дыхательных путей при сопоставлении с микробиотой лёгких. При анализе OTU's наиболее распространенными таксонами были определены *Pseudomonas*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*, микробиота лёгких была обогащена родами *Pseudomonas*, *Prevotella* и *Veilonella*. В данном случае наблюдалось явление колонизации лёгких бактериальными патогенами, которые могли транспортироваться из респираторного тракта. Развитие побочных патологических состояний, ассоциированных с муковисцидозом, происходит при анаэробнозе, вследствие повышения численности аэробных бактерий.

Было проведено метагеномное исследование легочной микробиоты детей с муковисцидозом на ранних стадиях его развития (Jorth et al., 2019). При исследовании образцов бронхоальвеолярного лаважа были обнаружены сообщества микроорганизмов, содержавших в своём составе патогенов ротовой полости. В их качестве были определены представители семейства *Alcaligenaceae*, которые включали рода *Achromobacter*, *Bukholderia* и *Bordetella*. Развитие инфекционных состояний, ассоциированных с муковисцидозом, таким образом, могло происходить при низком содержании *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veilonella* и повышении численности бактерий семейства *Alcaligenaceae*.

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* относятся к наиболее распространённым микроорганизмам, которые обеспечивают развитие инфекционных процессов, ассоциированных с муковисцидозом. В связи с этим исполь-

зуется специфическая терапия с участием антибиотиков, направленная на элиминацию данных патогенов. С другой стороны, были получены данные о возможном изменении представленности других компонентов легочной микробиоты в ходе терапии (Kramna et al., 2018). В исследовании использовался материал детей, больных муковисцидозом с наличием хронической инфекции, связанной с бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. Применение антипсевдомональной терапии способствовало уменьшению представленности некоторых бактериальных видов, включая *Streptococcus aureus* и *Streptococcus mitis*. В ходе анализа было также отмечено повышение содержания бактерий вида *Granulicatella* sp., что влияло на показатели объёма форсированного выдоха. Острые состояния патогенеза муковисцидоза могут быть связаны и с фунгиальной инфекцией. Грибы рода *Aspergillus* заселяют легочную систему пациентов с муковисцидозом и провоцируют возникновение состояний резистентности (Warris, 2019). Более 60 % больных муковисцидозом могут быть носителями *Aspergillus fumigates*, которые способствуют нарушению функциональной активности лёгких по причине активных воспалительных реакций.

Данное заболевание является хорошей моделью для тестирования метагеномных и метатранскриптомных технологий для выявления совместного вклада бактериального и вирусного компонента в развитие муковисцидоза (Lim et al., 2013). Объектом исследования являлись пробы мокроты, из которых выделялись нуклеиновые кислоты. По результатам исследования было отмечено влияние наличия ДНК организма-хозяина на уменьшение концентрации микробной ДНК при её выделении. Секвенирование генов 16S рРНК выявило снижение численности *Pseudomonas aeruginosa* в составе проб,

взятых от пациентов с муковисцидозом. Секвенирование вирусных генов позволило установить присутствие и роль фаговых частиц, бактериальных вирусов, которые способны инфицировать патогенные микроорганизмы, задействованные в прогрессировании муковисцидоза. Полномасштабное исследование особенностей микробиома в ходе развития данной патологии предполагает в дальнейшем объединение анализа метагенома, метатранскриптома и вирома.

Динамика состава микробных сообществ может определяться разными клиническими проявлениями муковисцидоза, обусловленными применением лекарственных препаратов и развитием острых проявлений болезни. Для детального тестирования подобных свойств было проведено комплексное исследование, включающее стандартный метагеномный анализ и мультиомиксный этап (исследования метаболома) (Hahn et al., 2020). Работа предполагала изучение динамики микробных сообществ у 14 пациентов с муковисцидозом в течение 12-месячного периода, а также выявление ассоциации между спецификой состава микробиоты и изменением метаболома. В процессе лечения муковисцидоза бактерии типа *Bacteroidetes* обладали меньшей численностью, чем представители *Stenotrophomonas*. Высокое содержание родов *Staphylococcus* и *Escherichia* было ассоциировано с повышением уровня метаболита спиртов, в случае высокого содержания *Achromobacter* наблюдалось повышение синтеза окисленных органических метаболитов.

Хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ)

ХОБЛ – заболевание, которое связано с нарушением дыхательной функции и ограничением воздушного потока. Дисбиоз сообществ бактериальных микроорганизмов

усиливает патогенез ХОБЛ. В данном случае происходит активное размножение патогенных видов (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*), определяющих дальнейшее развитие деструктивных процессов в лёгких. Патологические состояния развиваются по причине синтеза и экспрессии токсичных продуктов жизнедеятельности бактерий, а также усиления воспалительных реакций.

Для установления профиля микробиоты дыхательных путей при ХОБЛ были использованы методы количественного культивирования и секвенирования генов 16S рРНК (технология Illumina MiSeq) (Brill et al., 2016). Применение обоих методов указало на повышение численности родов *Streptococcus*, *Haemophilus* (73 % и 61 %), представители бактериальных родов *Veillonella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Prevotella* не были определены при использовании культивирования и имели низкие показатели численности (ниже 17 %) при секвенировании. В данном исследовании было отмечено, что в структуре микробиоты, ассоциированной с ХОБЛ, преобладают микроорганизмы, относящиеся к аэробам. Секвенирование 16S рРНК позволяло проводить характеристику компонентов микробиоты ХОБЛ, которые не могли быть установлены с помощью метода количественного культивирования.

Легочная эмфизема – одно из важных клинических проявлений ХОБЛ, развивается при условии изменения нормального состава бактериальных сообществ. Для детального исследования данной гипотезы проведена оценка состава бактериальной микробиоты в материале бронхоальвеолярного лаважа пациентов с пневмонией при использовании микробиологического культивирования и молекулярных методов метагеномного анали-

за (Naito et al., 2017). Молекулярные методы исследования микробиоты указали на высокую частоту встречаемости вида *Moraxella catarrhalis* у пациентов с острыми и средними проявлениями состояний пневмонии, ассоциированной с ХОБЛ. Процентное содержание видов *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa* не было связано с развитием эмфиземы определенной степени тяжести. Методы метагеномного анализа были также наиболее эффективны при детекции видов *Streptococcus angiosus* и *Streptococcus pneumoniae*, которые могли вносить вклад в развитие эмфиземы. Соответственно, представители *Moraxella catarrhalis* могут в большинстве случаев выступать в качестве факторов, повышающих риск возникновения осложнений, связанных с ХОБЛ.

Возникновение острых состояний ХОБЛ, а также различных осложнений, ассоциированных с данной патологией, может быть связано с колонизацией респираторного тракта бактериями *Pseudomonas aeruginosa* (Garcia-Nunez et al., 2015). Усиление патогенеза ХОБЛ в данном случае может происходить по причине способности бактерий к синтезу биоплёнок. В проведенном исследовании материал мокроты был получен от 21 пациента с ХОБЛ со стабильными и острыми проявлениями данной патологии. Проводилась оценка способности образования биоплёнки бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. В результате было отмечено, что высокий уровень их синтеза способствует повышению бактериального разнообразия микробиоты, что было определено при подсчёте OTU's. Увеличение численности определенных бактерий может усиливать острые проявления ХОБЛ.

При установлении роли микробиоты в прогрессировании острой формы ХОБЛ был использован материал легочной ткани пациентов (Pragman et al., 2018). Бактериальная

ДНК также выделялась из материала соскоба верхних дыхательных путей. В результате *Streptococcus* был доминирующим таксоном вне зависимости от специфики анализируемого материала. После проведения анализа главных координат (PCoA) были установлены таксоны, присутствие которых было специфично для определенной части легочной системы. Рода *Alloiococcus*, *Corynebacterium* и *Staphylococcus* имели высокую численность в материале соскобов верхних дыхательных путей, с легочной тканью были ассоциированы *Actinomycetales*, *Streptococcus* и *Rothia*. Анализ структуры микробиоты ХОБЛ позволил установить наличие высокой степени сходства между анализируемыми материалами. Несмотря на высокую степень информативности легочной ткани, в качестве предиктивных маркеров развития острой формы ХОБЛ могут также выступать сообщества микроорганизмов верхних дыхательных путей.

Ранее также была установлена совокупная роль бактериального и фунгиального компонентов микробиоты в развитии острых проявлений ХОБЛ (Su et al., 2015). Динамика изменений структуры микробных сообществ мокроты исследовалась путём секвенирования V4 варибельного региона, а также региона внутреннего транскрибируемого участка (Internal Transcribed Spacer (ITS)). В составе бактериома рода *Acinetobacter*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella* и *Actinomyces* были наиболее распространены у пациентов с ХОБЛ. В составе фунгиального компонента микробиоты преобладали *Candida*, *Phialosimplex*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* и *Eutypella*.

Острые деструктивные процессы в лёгких, ассоциированные с ХОБЛ, также сами могут быть фактором изменения состава микробиоты лёгких. При изучении данного явления присутствие бактериальных патогенов

в составе мокроты определялось с помощью секвенирования и количественной оценки экспрессии генов 16S рРНК (Jubinvill et al., 2018). Значимые изменения состава микробиоты при острых проявлениях ХОБЛ были отмечены относительно типов *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Развитие наиболее деструктивных форм патологии обуславливали изменения численности представителей *Streptococcus* и *Moraxella*. Методами метагеномного анализа, а также количественной оценки экспрессии генов установлено наличие бактериальных видов, которые относятся к нативным патогенам (*Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*). Были также определены таксоны, повышение численности которых было характерно для определенной степени развития ХОБЛ. При острых проявлениях ХОБЛ доминировали *Streptococcus pneumoniae* и *Moraxella catarrhalis*, вид *Haemophilus influenzae* преобладал при умеренном развитии ХОБЛ.

Усиление патогенеза ХОБЛ происходит по причине развития вентиляционных нарушений, возникающих в результате активности нативных патогенных микроорганизмов. Для раскрытия механизмов возникновения данных явлений было проведено исследование по оценке вариабельности паттернов орофарингеальной микробиоты (Карнаушкина и др., 2018). Динамика состава микробиоты оценивалась при проявлении разных вариантов патологических фенотипов ХОБЛ (хронический бронхит, эмфизема и смешанный тип). Было отмечено, что при развитии эмфиземы происходит повышение численности типов *Firmicutes*, *Anaerovibrio*, *Leuconostoc*, *Oceanobacillus*, *Phascolarctobacterium*, *Tetragenococcus*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Novosphingobium*. Данные таксоны относятся к комменсальным микроорганизмам. У индивидов с проявлениями фенотипа

«хронический бронхит» отмечалось повышенная обсемененность бактериальными типами: *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. У данной группы также было обнаружено повышение численности представителей родов, относящихся к условно-патогенным бактериям: *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Bacillus* и *Gemella*. В качестве наиболее распространенных видов были определены *Prevotella melaninogenica*, *Rothia mucilaginosa* и *Veillonella parvula*. Бактерии типа *Firmicutes* и *Bacteroidetes* преобладали у пациентов с наличием смешанного фенотипа. Общий анализ орофарингеальной микробиоты указал на сильную корреляцию бактериальных таксонов (семейств) *Moraxellaceae*, *Peptococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Staphylococcaceae* и *Actinomycetaceae* с ухудшением течения ХОБЛ и прогрессированием неблагоприятных патологических деструктивных процессов.

В качестве одного из потенциальных факторов развития ХОБЛ активно рассматривается курение. Для полного понимания его вклада в развитие дисбиоза при ХОБЛ было проведено метагеномное секвенирование материала мокроты 124 проб здоровых индивидов (28 курящих и 92 некурящих с нормальной функциональной активностью лёгких) и материала 218 пациентов с ХОБЛ, отобранного в клинических центрах и являющегося частью данных консорциума COPDMAP (Halдар et al., 2020). У здоровых индивидов вне зависимости от статуса курения наиболее преобладали (выше 88 % от общего числа полученных прочтений) типы *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*, а также рода *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Actinomyces* и *Rothia*. *Proteobacteria* рассматривался в качестве доминантного типа в со-

ставе микробиоты пациентов с ХОБЛ, рода *Haemophilus* и *Moraxella* имели пониженные показатели процентного содержания. Однако при сопоставлении данных здоровых индивидов и пациентов с ХОБЛ в зависимости от статуса курения значимых различий выявлено не было. Следует предположить, что различия между структурой микробиоты пациентов с ХОБЛ и здоровых индивидов не зависят от статуса курения.

Применение секвенирования полной длины генов может улучшать степень глубины анализа и выявлять подробную видовую структуру микробиоты. Подобный подход был использован при изучении вклада микробиоты верхних дыхательных путей при развитии ХОБЛ (Wang et al., 2020a). Материал мокроты был отобран от 98 пациентов с наличием стабильных проявлений ХОБЛ, а также от 27 здоровых индивидов для дальнейшего секвенирования полной длины последовательностей генов 16S рРНК с помощью высокопроизводительных технологий Pacific Biosciences. Проявление продолжительных острых фаз данной патологии было связано с присутствием вида *Ralstonia mannitolilytica*. В ходе анализа также были идентифицированы бактериальные виды, которые являются индукторами воспалительных реакций при проявлении разных патологических фенотипов ХОБЛ (эозинофильного и нейтрофильного). Виды *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Neisseria meningitidis* были ассоциированы с повышением экспрессии Th1, Th17 и других провоспалительных медиаторов. Представители вида *Tropheryma whippelii* способствовали активации факторов эозинофильного типа. Исследование внутригенных аллей 16S рРНК позволило определить структуру бактериальных линий внутри соответствующих родов. Линии 86–02NP, PittGG, которые относятся

к виду *Haemophilus influenzae*, были связаны с активацией хемокинов CCL17 и CCL13, что также могло предопределять развитие ХОБЛ по эозинофильному типу.

В настоящее время есть примеры применения метатранскриптомного анализа для изучения активной части микробиоты в процессе развития ХОБЛ (Ren et al., 2018). Например, в работе Ren с коллегами, опубликованной в 2018 году, сравнивали метатранскриптомы проб бронхоальвеолярной жидкости пациентов с острой формой ХОБЛ с материалом здоровых доноров (без наличия легочных заболеваний). Для обработки метатранскриптомных данных использовались программы Trimmomatic, Bowtie2 и SortMeRNA. Таксономическая аннотация прочтений выполнялась с использованием алгоритма картирования BLASTN и базы данных NCBI (National Center for Biotechnological Information). Профиль микробиома был дополнительно охарактеризован в метагеномном исследовании, при помощи анализа генов 16S рРНК. С этой целью консервативные V3-V4 участки гена 16S рРНК были амплифицированы и секвенированы. Данные анализировались на основе баз Mothur и SILVA. Секвенирование метагенома и метатранскриптома показало взаимоподтверждающие результаты, выявило присутствие одинакового числа бактериальных родов, равное 28. Однако данные анализов, полученных с использованием этих двух подходов, разошлись в том, какие именно таксоны присутствовали в пробах. 16S рРНК анализ указал на присутствие представителей рода *Acinetobacter* у пациентов с наличием ХОБЛ, в то время как метатранскриптомный подход позволил детектировать наличие родов *Ralstonia* и *Pseudomonas*.

В ещё одном исследовании оценили вклад определенных таксонов в развитие лёгкой и тяжёлой форм ХОБЛ средствами мета-

транскриптомного анализа (Lee et al., 2016). Хотя в пробах мокроты у пациентов с разными формами ХОБЛ уровень был повышен для одних и тех же типов бактерий, для таксонов *Bacteroides*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes* процентное содержание отличалось. В составе проб тяжелой формы ХОБЛ представители таксона *Prevotella* были наиболее часто встречающимися компонентами, в то время как представленность бактерий рода *Acinetobacter* уменьшалась. У группы пациентов с лёгкой формой ХОБЛ было обнаружено повышение уровня бактерий типов *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Таким образом, метатранскриптомный анализ в проведенном исследовании показал, что представители типа *Proteobacteria* в равной степени обладали повышенным содержанием при развитии как лёгкой, так и тяжелой форм ХОБЛ. Однако были найдены различия на уровне рода. Бактерии родов *Haemophilus*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Prevotella* и *Porphyromonas* характеризовались наибольшей численностью в пробах тяжёлой формы ХОБЛ по сравнению с лёгкой. Пробы, полученные от пациентов с наличием лёгкой формы данного заболевания главным образом содержали рода *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* и *Porphyromonas*.

Для получения и дальнейшего анализа данных метатранскриптома важен правильный выбор биологического материала. Для изучения особенностей микробиома ХОБЛ является целесообразным использование мокроты (Ditz et al., 2020). Использование мокроты имеет как преимущества, так и ограничения. К преимуществам можно отнести то, что процедура забора проб осуществляется неинвазивно, материал позволяет охарактеризовать полный состав микробиома лёгких, в то время как пробы буккального эпителия, слюны или орофарингеальных маз-

ков позволяют исследовать наличие только специфических бактерий. Для успешного метатранскриптомного анализа следует стандартизировать этапы отбора проб и выделения РНК, следует оптимизировать биоинформатический анализ с учётом особенностей анализируемой биологической жидкости.

Определение функциональной значимости микробиоты легочной системы при развитии ХОБЛ становится возможным при проведении мультиомиксных исследований. В соответствии с этим был проведен метаанализ крупных репозиторий с наличием данных о метагеноме и транскриптоме ХОБЛ (Wang et al., 2020b). Метаанализ метагеномных исследований ХОБЛ позволил определить наиболее распространенные бактериальные рода: *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Moraxella* и *Lactobacillus*. Для ХОБЛ также было характерно понижение встречаемости *Selenomonas*, *Leptotrichia*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Campylobacter*, *Catonella* и *Prevotella*. Средствами пакета программ PICRUST-2 был проведен анализ изменений экспрессии генов, которые происходили под действием активности микробиоты. Было определено повышение уровня экспрессии 17 генов, вовлеченных в биотрансформацию ксенобиотиков, метаболизм углеводов, пептидогликанов и аминокислот. Таксоны *Haemophilus*, *Moraxella* и *Streptococcus* способствовали повышению экспрессии этих генов. 9 генов были задействованы в биосинтезе вторичных метаболитов, липидов и жирных кислот, комменсальные бактериальные рода *Veilonella* и *Prevotella*, которые обладали пониженной численностью у пациентов с ХОБЛ, вносили значимый вклад в контроль экспрессии данной группы генов. С помощью метода PRMT (Predictive Relative Metabolic Turnover) был исследован вклад специфического состава микробиоты в изменение осо-

бенностей метаболизма при развитии ХОБЛ. Для патологических состояний была отмечена характерная активация метаболических путей, связанных с синтезом пальмитата и N-ацетил-D-маннозамина, а также нарушением синтеза D-аспартата.

Астма

Астма относится к наиболее распространенным хроническим заболеваниям. Ключевым моментом его развития является образование бронхоспазмов, в результате сужения просвета бронхов. Дыхательная функция нарушается по причине активации иммунологических и других неспецифических механизмов. Бронхиальная астма обуславливает наиболее высокие показатели заболеваемости и смертности среди населения. Для исследования этиологии данного заболевания целесообразным является установление вклада микробиома легочной системы.

Метагеномные исследования микробиоты позволяют выработать новые подходы по диагностике и лечению астмы (Huang, 2013). Наибольшее внимание сфокусировано на особенностях состава микробиоты дыхательных путей и кишечника, а также на взаимодействии их компонентов с факторами окружающей среды. Развитие детской астмы может происходить по причине наличия специфических особенностей разнообразия микробиоты дыхательных путей (Thorsen et al., 2019). Секвенирование ампликонов 16S рРНК, полученных от 700 детей с диагнозом астма, позволило установить структуру микробиоты в течение первых трёх месяцев жизни. Бактериальные рода *Veilonella* и *Prevotella* были ассоциированы с проявлением патологических состояний начиная с первого месяца. Повышенное содержание этих микроорганизмов было связано с понижением экспрессии ФНО- α и ИЛ-1 β , а также

активацией хемокинов CCL2 и CCL17. Проведенное исследование указывает на взаимодействие микробиоты дыхательных путей с компонентами иммунитета. Это явление может рассматриваться как один из потенциальных механизмов развития детской астмы.

Материал детей и взрослых с наличием астмы был исследован в течение проявления патологии и стабильного состояния здоровья (Perez-Losada et al., 2017). У участников эксперимента отбирался материал назофарингеальных смывов, технологии секвенирования нового поколения использовались для исследования V4 региона 16S рРНК. Более 86 % полученных в ходе секвенирования последовательностей соответствовали бактериальным родам *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Dolosigranulum*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Fusobacterium* и *Nisseriaceae*. Эти таксоны были идентифицированы как у детей, так и у взрослых в разных пропорциях. Сезонная динамика (летний и осенний периоды) микробиоты дыхательных путей была связана с вариабельностью показателей родов *Haemophilus*, *Moraxella*, *Staphylococcus* и *Corynebacterium*.

На примере детской астмы было проведено исследование влияния микробиоты верхних дыхательных путей на патофизиологические особенности развития данного заболевания (Zhou et al., 2019). 319 проб назальных мазков были отобраны при развитии лёгкой формы астмы, а также при проявлении обострённых состояний заболевания. Наличие повышенных показателей комменсальных бактериальных родов *Corynebacterium* и *Dolosigranulum* способствовало понижению вероятности развития острой формы астмы. Повышение численности бактерий рода *Moraxella* увеличивало риск возникновения усиленного патогенеза и развития острых состояний астмы. Представители рода

Corynebacterium могли рассматриваться в качестве протективных компонентов микробиоты дыхательных путей.

Ранее при проведении исследований назальной микробиоты были выявлены основные таксоны, которые характерны для состояний детской астмы (Perez-Losada et al., 2018). Анализ кластеров OTU's выявил повышенное содержание (более 95 %) патогенных бактериальных родов *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Haemophilus*. Бактериальные типы *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, а также рода *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Dolosigranulum* и *Prevotella*, в данном исследовании характеризовались высокой степенью вариабельности в зависимости от наличия определенного патоморфологического профиля астмы и других клинических проявлений.

Анализ состава микробиоты дыхательных путей также позволяет оценить механизмы развития разных типов астмы. Был использован материал мокроты 24 пациентов с наличием астмы (10 с диагнозом эозинофильная астма и 12 пациентов с астмой, не связанной с эозинофилией), а также 12 здоровых доноров (Pang et al., 2019). Пациенты с разными типами астмы отличались по 6 бактериальным родам: рода *Claciicola* и *Helicobacter* были наиболее распространены у больных эозинофильной астмой, *Deinococcus*, *Scardovia*, *Bifidobacterium* и *Desulphobulbus* были ассоциированы с развитием неэозинофильной формы. Функциональный анализ микробиоты с помощью базы данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) в данном исследовании установил возможность влияния микроорганизмов на экспрессию генов, вовлечённых в развитие других заболеваний. К ним относятся инфекционные патологии, болезни иммунной системы, а также нарушения метаболизма.

Проведение характеристики состава орофарингеальной микробиоты позволяет выяснить роль микроорганизмов легочной системы в развитии бронхиальной астмы и других хронических заболеваний лёгких (Огородова и др., 2015). Микробиота пациентов с острой формой бронхиальной астмы содержала пониженные показатели численности представителей рода *Prevotella* на фоне повышения представленности бактериальных родов *Odoribacter*, *Alloiococcus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Sneathia*, а также видов *Bifidobacterium longum*, *Prevotella nancienensis*, *Neisseria cinerea*, *Aggregatibacter segnis*. Эти различия указывают на изменение специфического состава бактериальных сообществ при развитии астмы разной степени тяжести. Выявленные в данном исследовании таксоны могут рассматриваться в качестве клинических маркеров при диагностике данной патологии.

Недавнее исследование охарактеризовало влияние состава назальной микробиоты на развитие астмы разной степени тяжести у взрослых пациентов (Fazlollahi et al., 2018). Секвенирование генов рибосомальной РНК 72 человек (20 с проявлением тяжелой формы астмы, 31 с наличием лёгкой формы заболевания и 21 здоровых контролей) было выполнено для описания профиля орофарингеальной микробиоты. Методы статистики PERMANOVA определили бактериальные типы *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* в качестве наиболее распространенных таксонов у пациентов с развитием астмы. В составе назальной микробиоты пациентов с проявлениями тяжелой формы астмы было характерно наличие *Prevotella*, *Alkanindiges* и *Gardnerella*, содержание рода *Dialister* было значимо выше у больных лёгкой формой. Для выявления бактериальных видов, вносящих значимый вклад в развитие определенной формы аст-

мы был проведён анализ OTU's с помощью LEfSe метода, а также линейный дискриминантный анализ. В результате присутствие таких видов, как *Prevotella buccalis*, *Dialister invisus*, *Gardnerella vaginalis* и *Alkanindiges hongkongensis*, было наиболее характерно для микробиоты, ассоциированной с острыми проявлениями астмы. Проведенная оценка экспрессии генов 16S рРНК указала на повышенные показатели таксонов *Prevotella buccalis* и *Gardnerella vaginalis* у пациентов с наличием астмы.

В настоящее время множество информации получено о влиянии дисбиоза орофарингеальной микробиоты на развитие усиленных воспалительных реакций, способствующих возникновению патогенетических состояний астмы. В качестве возможного механизма также могут быть рассмотрены особенности взаимодействия бактериального и фунгиального компонентов микробиоты мокроты (Liu et al., 2020). С целью анализа использовался материал мокроты 116 пациентов со стабильными проявлениями астмы и 29 здоровых индивидов. Ген 16S рРНК использовался для установления структуры бактериальных сообществ, для характеристики фунгиальных сообществ исследовался ITS 1 регион. Микробные рода *Moraxella*, *Capnocytophaga*, *Ralstonia* (бактериальный микробиом), а также *Schizophyllum*, *Candida*, *Phialemoniopsis* (фунгиальный микробиом) были наиболее характерны для пациентов с астмой, микробиота легочной системы здоровых людей была обогащена бактериальными родами *Rothia*, *Veillonella* и *Leptotrichia*, а также фунгиальным родом *Meyerozyma*.

Свойства фунгиальной микробиоты могут предопределять развитие эозинофильной и нейтрофильной астмы (Sharma et al., 2019). Влияние микробиоты в данном случае связано с активацией воспалительного пути эо-

зинофильного типа, умеренная активность обуславливает возникновение нейтрофильного типа астмы. При анализе материала бронхоэндотелиального соскоба отмечено более высокое разнообразие таксонов у пациентов с эозинофильным типом воспаления, *Trichoderma* был определен в качестве наиболее распространенного фунгиального рода. Для проявлений нейтрофильной астмы было характерно повышение численности грибов рода *Penicillium*. В составе фунгиальной микробиоты бронхоальвеолярного лаважа доминирующими родами были *Cladosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*.

С целью исследования этиологии астмы был выполнен транскриптомный анализ генов организма человека и микробиоты верхних дыхательных путей (Perez-Losada et al., 2015). Сравнивались данные транскриптомного и метатранскриптомного анализа 8 пациентов с астмой и 6 здоровых индивидов. В качестве референсной базы данных использовался репозиторий NCBI-NR. Оценивались изменения в метаболических процессах и вклад микробных генов в эти биохимические пути с использованием ресурсов COG, SEED и KEGG. Методы мультивариационной статистики использовались для раскрытия особенностей состава микробных сообществ и экспрессии генов человеческого организма. Результаты исследования позволили идентифицировать представителей семейства *Moraxellaceae* – бактерий *Moraxella catarrhalis* – как основных индукторов патогенных процессов во время развития астмы. *M. catarrhalis* были уже определены в качестве основных этиологических факторов развития астмы у детей (Teo et al., 2015). Дисбаланс метаболических реакций уже был указан в качестве основного фактора развития заболеваний, в частности синдрома раздражённого кишечника (IBD), в развитии которого роль микробиоты была установле-

на. В настоящее время становится всё более очевидным, что бактериальные гены, вовлеченные в процессы метаболизма, экспрессии транспортных белков и факторов адгезии, могут вносить вклад в патогенез астмы.

Рак лёгкого (РЛ)

В настоящее время РЛ рассматривается как группа заболеваний, обуславливающих наиболее высокий уровень смертности в мире. Подверженность воздействию поллютантов, сигаретный дым и генетический полиморфизм могут рассматриваться как главные факторы предрасположенности к данной патологии. Нарушенная нормальная микробиота респираторного тракта или её патогенная составляющая способствуют развитию воспалительных реакций и усиливают прогрессию РЛ. Дисбаланс микробных сообществ может выражаться в понижении численности нейтральной или комменсальной компоненты бактериома и повышении активности патогенных бактериальных видов.

Было проведено исследование по определению различий состава легочной микробиоты при развитии плоскоклеточного типа РЛ и аденокарциномы (Gomes et al., 2019). Разнообразие микроорганизмов было проанализировано в соответствии со статусом курения пациентов и степенью обструкции респираторного тракта. При анализе последовательностей 16S рРНК различия между пациентами с РЛ и здоровыми контролями были найдены на уровне бактериальных типов *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Среди родов значимых различий выявлено не было, в качестве наиболее распространенных таксонов в обеих группах сравнения были определены *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Actinomyces* и *Prevotella*. Анализ метатранскриптомных последовательностей указал на преобладание этих же

таксонов, однако были получены другие показатели их процентного содержания. Тип *Proteobacteria* обуславливал различия между микробиотой пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком, а также преобладал у мужчин и был ассоциирован с курением. Обобщенный метагеномный и метатранскриптомный анализ позволил установить корреляцию между специфическим составом микробиоты и развитием определенной гистопатологической группы РЛ.

Исследование механизма развития дисбиоза легочной микробиоты может существенно улучшить представления о развитии РЛ (Xu et al., 2020). В настоящее время в контексте исследований РЛ в особенности рассматривается дисбиоз микробиоты слюны, который может быть ассоциирован с системным воспалением и изменением особенностей экспрессии метаболитов (Zhang et al., 2019). С целью оценки значения дисбиоза микробиоты было проведено исследование, в котором был сопоставлен её таксономический состав у пациентов с РЛ и индивидов с наличием других незлокачественных заболеваний лёгких (Cheng et al., 2020). Значимые различия между группами сравнения были обнаружены посредством применения метода PCoA. В составе микробиоты, ассоциированной с развитием РЛ, были обнаружены микроорганизмы относящиеся к типу *TM7* и родам *Capnocytophaga*, *TM7-3*, *Sediminibacterium*, *Gemmiger*, *Balutia* и *Oscillospira*. Данные таксоны можно определить в качестве потенциальных маркеров развития РЛ. В ходе исследования также была проведена оценка активации метаболических путей микробиоты у разных групп пациентов. Анализ проводился с использованием базы данных KEGG с применением LEfSe метода. Группы бактерий больных РЛ характеризовались повышением активности

синтеза пуриновых и пиримидиновых оснований. В составе контрольной группы было отмечено повышение активности метаболических путей, связанных с синтезом жгутиков, а также функционированием двухкомпонентной системы бактерий и их системы секреции.

Использование материала легочной ткани для исследования структуры микробиоты позволяет наиболее информативно исследовать потенциальные маркеры развития РЛ. Проведенная работа указала на отличия в структуре профиля микробиоты у курильщиков, больных РЛ, и у пациентов с наличием эмфиземы (Liu et al., 2018). Материал дистальной паренхимы лёгких был использован для выделения бактериальной ДНК, анализ таксономического состава проводился путём секвенирования варибельного участка V4 гена 16S рРНК. Группы исследования включали в себя 40 курильщиков: 10 с диагнозом эмфизема, 11 с наличием РЛ, 19 человек характеризовались наличием обеих патологий. Анализ микробиоты показал, что в материале пациентов с эмфиземой была отмечена наименьшая степень разнообразия микроорганизмов. В то же время состав легочной микробиоты пациентов с РЛ (без или с наличием эмфиземы) характеризовался наименьшими значениями содержания бактерий типа *Proteobacteria* (преимущественно родов *Acinetobacter* и *Acidovorax*), а также повышением численности представителей типа *Firmicutes* (род *Streptococcus*) и *Bacteroidetes* (род *Prevotella*).

В одном из исследований удалось выявить влияние микробиома нормальных тканей легкого на безрецидивную выживаемость пациентов с РЛ (Peters et al., 2019). Были изучены парные образцы тканей легкого (опухолевая и нормальная ткань) у 19 пациентов с немелкоклеточным РЛ. Повы-

шение численности представителей семейства *Koribacteriaceae* в нормальных тканях наблюдалось у пациентов с большей продолжительностью жизни без рецидивов заболевания. Обогащенность нетрансформированных тканей легкого бактериями из семейств *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* была связана со снижением продолжительности жизни пациентов без рецидивов. В целом авторы делают вывод, что большое разнообразие микробиома нормальных тканей связано с уменьшением безрецидивной выживаемости больных.

При проведении сравнения профилей легочной микробиоты, ассоциированной с развитием РЛ и доброкачественными опухолями, были найдены статистически значимые различия (Choi et al., 2016). Материал бронхоальвеолярного лаважа использовался для анализа состава сообществ микроорганизмов методом секвенирования нового поколения 16S рибосомальных генов и системой MALDI-TOF MS. В ходе эксперимента участвовали 20 индивидов с диагнозом РЛ и 8 пациентов с наличием доброкачественных опухолей. У 13 пациентов была диагностирована аденокарцинома, у 5 плоскоклеточный рак, остальные 2 имели диагноз мелко-клеточный РЛ. Анализ таксономии позволил определить бактериальные типы *Firmicutes* и *TM7*, а также рода *Veillonella*, *Megasphaera*, *Atopobium* и *Selenomonas* в качестве наиболее распространенных у пациентов с РЛ. Бактериальный род *Veillonella* был идентифицирован с использованием метода MALDI-TOF MS у 14 пациентов с РЛ и 5 с наличием доброкачественных опухолей, представители рода *Megasphaera* были выявлены у 3 пациентов с РЛ, наличие представителей рода *Selenomonas* определено не было.

Микробные сообщества дыхательных путей также могут быть рассмотрены в каче-

стве модуляторов развития РЛ (Goto, 2020). Функционирование иммунной системы и специфика иммунной терапии РЛ может определяться активностью легочной микробиоты (Ramirez-Labrada et al., 2020). Проявление онкогенных свойств данных микроорганизмов связано с синтезом генотоксических факторов, взаимодействием с компонентами иммунной системы, а также клетками опухоли. Множественная активность микробиоты влияет на особенности иммунотерапии при применении ингибиторов сигнальных молекул (Shaikh et al., 2019).

Состав микробиоты может быть ассоциирован с развитием рецидивов после терапии на ранних стадиях. Состав легочной микробиоты был проанализирован с использованием материала бронхоальвеолярного лаважа и слюны, отобранных у пациентов до хирургического вмешательства (Patnaik et al., 2021). Также был использован материал опухолевых тканей, удалённых на первой стадии развития РЛ. Микробиота пациентов с наличием рецидивов значимо отличалась от таковой у больных РЛ без их проявления вне зависимости от гендерной принадлежности, статуса курения и возраста (при использовании материала бронхоальвеолярного лаважа). Специфический состав микробиоты, ассоциированный со снижением выживаемости при отсутствии рецидивов, способствовал усилению экспрессии опухолевых генов, необходимых для клеточной пролиферации и эпителиально-мезенхимального перехода. Состав клеток иммунной системы и микроокружение не отличалось у пациентов с разной степенью развития РЛ. Таким образом, исследование состава респираторной микробиоты перед оперативным вмешательством может предопределять специфичность терапии немелкоклеточного типа РЛ, а также позволять прогнозировать возможные рецидивы.

Недавнее исследование позволило оценить синергизм вклада легочной микробиоты и мутаций в гене *TP53* в развитие предрасположенности к РЛ (Greathouse et al., 2018). Для установления состава микробиома были использованы две стратегии анализа 16S рРНК. Результаты секвенирования 16S рРНК были сопоставлены с таковыми, полученными при использовании флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Общепринятый анализ 16S рРНК сопровождался интерпретацией результатов РНК-секвенирования с использованием базы The Cancer Genome Atlas (TCGA). Было выявлено увеличение численности бактерий типа *Proteobacteria* при одновременном уменьшении бактерий типа *Firmicutes*, оценивалось также бэта-разнообразие. Состав микробиома варьировал в зависимости от вида РЛ и типа исследованной ткани, как следует из результатов статистической обработки с помощью метода анализа PERMANOVA. Данное исследование указало на равный вклад методов анализа 16S рРНК и RNA-seq в изучение вклада микробиома.

Развитие РЛ также связывают с реактивностью иммунной системы. Было показано, что комменсальная часть микробиоты может усиливать развитие онкогенеза путём активации $\gamma\beta$ Т-клеток адаптивной иммунной системы (Jin et al., 2019). $\gamma\beta$ Т-клетки в ответ на определённые виды бактерий начинают усиленно экспрессировать цитокины, что стимулирует развитие онкогенного микроокружения. Была показана ассоциативная связь между уровнем бактерий *Herbaspirillum* и *Sphingomonadaceae* и возникновением случаев РЛ, в то время как лёгкие здоровых доноров содержали значительно больше бактерий *Aggregatibacter* и *Lactobacillus*. Для выявления различий в представленности бактериальных таксонов в пробах РЛ (аденокарциномы и плоскоклеточной формы РЛ) и контролей использовали Path-seq

анализ. Path-seq является компьютерным алгоритмом, который основан на выравнивании геномных и транскриптомных последовательностей организма-хозяина и бактерий. Данный анализ показал, что со злокачественными процессами было связано повышение численности *Betaproteobacteria* and *Burkholderiales*, в то время как для здоровых лёгких характерно наличие *Gamma*proteobacteria and *Pseudomonadales*. Таким образом, совместно 16S рРНК анализ и использование базы данных TCGA позволило выявить компоненты микробиоты лёгких, ассоциированных с развитием РЛ.

Заключение

Интегрированный метагеномный и метатранскриптомный анализ микробиоты лёгких, использованный при изучении детской астмы и ХОБЛ, выявил положительную корреляцию результатов. Метагеномные данные, таким образом, могут использоваться в качестве дополнения к информации о транскриптоме микроорганизмов. Детальный метатранскриптомный анализ мокроты позволил установить, что пациенты с наследственными (муковисцидоз) и онкологическими заболеваниями лёгких (различные подтипы РЛ) характеризуются наличием уникального состава микробиоты, который, вероятно, способствует развитию воспалительных реакций и прогрессированию заболеваний. Выявлен синергизм вклада легочной микробиоты и мутаций в гене *TP53* в развитие предрасположенности к РЛ.

Данные метатранскриптомных исследований, помимо структуры таксономического состава микробиоты, содержат информацию о профиле активно экспрессирующихся генов микроорганизмов. Высокопроизводительные технологии RNA-seq позволяют идентифицировать ранее неизученные микроорганизмы на молекулярном уровне. Метатранскриптомный анализ дает возможность исследования метаболических путей, в которые вовлечены микроорганизмы, и позволяет осуществлять поиск функционально значимых компонентов некодирующей регуляторной части генома микроорганизмов. Становится возможным изучение новых генетических маркеров различных патологических состояний, механизмов инициации и прогрессирования заболеваний.

Несмотря на большое количество исследований, многие вопросы относительно роли микробиоты в патогенезе заболеваний остаются дискуссионными и далекими от своего разрешения. Международные научные проекты, такие как Integrative Human Microbiome Project – (ИМП), продемонстрировали эффективность мультиомиксных подходов. Использование метагеномики, метатранскриптомики, метаболомики и метапротеомики будет не только стимулировать применение новых высокотехнологичных методов в молекулярной биологии, но и позволит наиболее полно охарактеризовать сложную структуру микробиоты человека и её значимость в норме и патологии.

Список литературы/ References

- Карнаушкина М.А., Федосенко С.В., Сазонов А.Э., Петров В.А., Овсянников Д.Ю., Огородова Л.М. (2018) Микробиологические орофарингеальные паттерны у больных различными фенотипами хронической обструктивной болезни лёгких. *Современные технологии в медицине*, 10(2): 101–109 [Karnaushkina M. A., Fedosenko S. V., Sazonov A. E., Petrov V. A., Ovsyannikov D. Yu., Ogorodova L. M. (2018) Microbiological oropharyngeal patterns in patients with different phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, 10(2): 101–109 (in Russian)]

Огородова Л. М., Федосенко С. В., Попенко А. С., Петров В. А., Тяхт А. В., Салтыкова И. В., Деев И. А., Куликов Е. С., Кириллова Н. А., Говорун В. М., Кострюкова Е. С. (2015) Сравнительный анализ орофарингеальной микробиоты у больных хронической обструктивной болезнью и бронхиальной астмой различной степени тяжести. *Вестник Российской Академии Медицинских Наук*, 70(6): 669–678 [Ogorodova L. M., Fedosenko S. V., Popenko A. S., Petrov V. A., Tyakht A. V., Saltykova I. V., Deev I. A., Kulikov E. S., Kirillova N. A., Govorun V. M., Kostryukova E. S. (2015) Comparison study of oropharyngeal microbiota in case of bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease in different severity levels. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* [Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk], 70(6): 669–678 (in Russian)]

Barta J. A., Powell C. A., Wisnivesky J. P. (2019) Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*, 85(1): 8

Bikel S., Valdez-Lara A., Cornejo-Granados F., Rico K., Canizales-Quinteros S., Soberón X., Del Pozo-Yauner L., Ochoa-Leyva A. (2015) Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a system-level understanding of human microbiome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13: 390–401

Brill S., James P., Cuthbertson L., Cox M., Cookson W., Wedzicha J., Moffatt M. (2016) Profiling the COPD airway microbiome using quantitative culture and 16S rRNA gene sequencing. *European Respiratory Journal*, 48(suppl 60): OA1787

Cheng C., Wang Z., Wang J., Ding C., Sun C., Liu P., Xu X., Liu Y., Chen B., Gu B. (2020) Characterization of the lung microbiome and exploration of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 9(3): 693–704

Choi J., Pack M. S., Yong D. E., Sung J. Y., Lee S. H., Lee E. H., Park J. E., Shin M. H. (2016) Characterization of microbiome in patients with lung cancer comparing with benign mass-like lesions. *European Respiratory Journal*, 48(suppl 60): PA1208

Cozzuto L., Liu H., Prysycz L. P., Pulido T. H., Delgado-Tejedor A., Ponomarenko J., Novoa E. M. (2020) MasterOfPores: A workflow for the analysis of Oxford Nanopore Direct RNA sequencing datasets. *Frontiers in Genetics*, 11: 211

Ditz B., Christenson S., Rossen J., Brightling C., Kerstjens H. A. M., van den Berge M., Faiz A. (2020) Sputum microbiome profiling in COPD: beyond singular pathogen detection. *Thorax*, 75(4): 338–344

Fazlollahi M., Lee T. D., Andrade J., Oguntuyo K., Chun Y., Grishina G., Grishin A., Bunyavanich S. (2018) The nasal microbiome in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(3): 834–843.e2

Franzosa E. A., McIver L. J., Rahnvard G., Thompson L. R., Schirmer M., Weingart G., Lipson K., Knight R., Caporaso J. G., Segata N., Huttenhower C. (2018) Species-level functional profiling of metagenomes and metatranscriptomes. *Nature Methods*, 15(11): 962–968

Franzosa E. A., Morgan X. C., Segata N., Waldron L., Reyes J., Earl A. M., Giannoukos G., Boylan M. R., Ciulla D., Gevers D., IZard J., Garrett W. S., Chan A. T., Huttenhower C. (2014) Relating metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22): E 2329–E 2338

Frost F., Walshaw M. J., Nazareth D. (2020) Cystic fibrosis-related diabetes: an update. *QJM: An International Journal of Medicine*, hcaa256

- García-Núñez M., Martí S., Puig C., Pérez-Brocá V., Millares L., Liñares F., Monso E. (2015) Influence of biofilm on the bronchial microbiome in COPD patients colonized or infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *European Respiratory Journal*, 46(suppl 59): PA5028
- Gomes S., Cavadas B., Ferreira J.C., Marques P.I., Monteiro C., Sucena M., Sousa C., Vaz Rodrigues L., Teixeira G., Pinto P., Tavares de Abreu T., Barbara C., Semedo J., Mota L., Carvalho A.S., Matthiesen R., Pereira L., Seixas S. (2019) Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, 9(1): 12838
- Goto T. (2020) Airway microbiota as a modulator of lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9): 3044
- Greathouse K.L., White J.R., Vargas A.J., Bliskovsky V.V., Beck J.A., von Muhlinen N., Polley E.C., Bowman E.D., Khan M.A., Robles A.I., Cooks T., Ryan B.M., Padgett N., Dzutsev A.H., Trinchieri G., Pineda M.A., Bilke S., Meltzer P.S., Hokenstad A.N., Stickrod T.M., Walther-Antonio M.R., Earl J.P., Mell J.C., Krol J.E., Balashov S.V., Bhat A.S., Ehrlich G.D., Valm A., Deming C., Conlan S., Oh J., Segre J.A., Harris C.C. (2018) Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer. *Genome Biology*, 19(1): 123
- Hahn A., Bendall M.L., Gibson K.M., Chaney H., Sami I., Perez G.F., Koumbourlis A.C., McCaffrey T.A., Freishtat R.J., Crandall K.A. (2018) Benchmark evaluation of true single molecular sequencing to determine cystic fibrosis airway microbiome diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1069
- Hahn A., Whiteson K., Davis T.J., Phan J., Sami I., Koumbourlis A.C., Freishtat R.J., Crandall K.A., Bean H.D. (2020) Longitudinal associations of the cystic fibrosis airway microbiome and volatile metabolites: a case study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 174
- Haldar K., George L., Wang Z., Mistry V., Ramsheh M.Y., Free R.C., John C., Reeve N.F., Miller B.E., Tal-Singer R., Webb A.J., Brookes A.J., Tobin M.D., Singh D., Donaldson G.C., Wedzicha J.A., Brown J.R., Barer M.R., Brightling C.E. (2020) The sputum microbiome is distinct between COPD and health, independent of smoking history. *Respiratory Research*, 21(1): 183
- Heintz-Buschart A., May P., Laczny C.C., Lebrun L.A., Bellora C., Krishna A., Wampach L., Schneider J.G., Hogan A., de Beaufort C., Wilmes P. (2016) Integrated multi-omics of the human gut microbiome in a case study of familial type 1 diabetes. *Nature Microbiology*, 2(1): 16180
- Huang Y.J. (2013) Asthma microbiome studies and the potential for new therapeutic strategies. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(5): 453–461
- Ibironke O., McGuinness L.R., Lu S.-E., Wang Y., Hussain S., Weisel C.P., Kerkhof L.J. (2020) Species-level evaluation of the human respiratory microbiome. *GigaScience*, 9(4): GIAA038
- Jin C., Lagoudas G.K., Zhao C., Bullman S., Bhutkar A., Hu B., Ameh S., Sandel D., Liang X.S., Mazzilli S., Whary M.T., Meyerson M., Germain R., Blainey P.C., Fox J.G., Jacks T. (2019) Commensal microbiota promote lung cancer development via $\gamma\beta$ T cells. *Cell*, 176(5): 998–1013.e16
- Jorth P., Ehsan Z., Rezayat A., Caldwell E., Pope C., Brewington J.J., Goss C.H., Benschoter D., Clancy J.P., Singh P.K. (2019) Direct lung sampling indicates that established pathogens dominate early infections in children with cystic fibrosis. *Cell Reports*, 27(4): 1190–1204.e3
- Jorth P., Turner K.H., Gumus P., Nizam N., Buduneli N., Whiteley M. (2014) Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *mBio*, 5(2): e01012–14
- Jubenville E., Veillette M., Milot J., Maltais F., Comeau A.M., Levesque R.C., Duchaine C. (2018) Exacerbation induces a microbiota shift in sputa of COPD patients. *PLoS One*, 13(3): e0194355

Kopylova E., Navas-Molina J.A., Mercier C., Xu Z.Z., Mahé F., He Y., Zhou H.-W., Rognes T., Caporaso J.G., Knight R. (2016) Open-source sequence clustering methods improve the state of the art. *mSystems*, 1(1): e00003–15

Kovaleva O. V., Romashin D., Zborovskaya I. B., Davydov M. M., Shogenov M. S., Gratchev A. (2019) Human lung microbiome on the way to cancer. *Journal of Immunology Research*, 2019: 1394191

Kramná L., Dřevínek P., Lin J., Kulich M., Cinek O. (2018) Changes in the lung bacteriome in relation to antipseudomonal therapy in children with cystic fibrosis. *Folia Microbiologica*, 63(2): 237–248

Lee S. W., Kuan C.-S., Wu L. S.-H., Weng J. T.-Y. (2016) Metagenome and metatranscriptome profiling of moderate and severe COPD sputum in Taiwanese han males. *PLoS One*, 11(7): e0159066

Lim Y. W., Schmieder R., Haynes M., Willner D., Furlan M., Youle M., Abbott K., Edwards R., Evangelista J., Conrad D., Rohwer F. (2013) Metagenomics and metatranscriptomics: windows on CF-associated viral and microbial communities. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(2): 154–164

Liu H.-Y., Li C.-X., Liang Z.-Y., Zhang S.-Y., Yang W.-Y., Ye Y.-M., Lin Y.-X., Chen R.-C., Zhou H.-W., Su J. (2020) The interactions of airway bacterial and fungal communities in clinically stable asthma. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1647

Liu Y., O'Brien J.L., Ajami N.J., Scheurer M.E., Amirian E.S., Armstrong G., Tsavachidis S., Thrift A.P., Jiao L., Wong M.C., Smith D.P., Spitz M.R., Bondy M.L., Petrosino J.F., Kheradmand F. (2018) Lung tissue microbial profile in lung cancer is distinct from emphysema. *American Journal of Cancer Research*, 8(9): 1775–1787

Lucas S.K., Yang R., Dunitz J.M., Boyer H.C., Hunter R.C. (2018) 16S rRNA gene sequencing reveals site-specific signatures of the upper and lower airways of cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(2): 204–212

Lugowski A., Nicholson B., Rissland O.S. (2018) DRUID: a pipeline for transcriptome-wide measurements of mRNA stability. *RNA*, 24(5): 623–632

Maddi A., Sabharwal A., Violante T., Manuballa S., Genco R., Patnaik S., Yendamuri S. (2019) The microbiome and lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 11(1): 280–291

Martinez X., Pozuelo M., Pascal V., Campos D., Gut I., Gut M., Azpiroz F., Guarner F., Manichanh C. (2016) MetaTrans: an open source pipeline for metatranscriptomics. *Scientific Reports*, 6: 26447

Milanese A., Mende D.R., Paoli L., Salazar G., Ruscheweyh H.-J., Cuenca M., Hingamp P., Alves R., Costea P.I., Coelho L.P., Schmidt T.S.B., Almeida A., Mitchell A.L., Finn R.D., Huerta-Cepas J., Bork P., Zeller G., Sunagawa S. (2019) Microbial abundance, activity and population genomic profiling with mOTUs2. *Nature Communications*, 10(1): 1014

Naito K., Yamasaki K., Yatera K., Akata K., Noguchi S., Kawanami T., Fukuda K., Kido T., Ishimoto H., Mukae H. (2017) Bacteriological incidence in pneumonia patients with pulmonary emphysema: a bacterial floral analysis using the 16S ribosomal RNA gene in bronchoalveolar lavage fluid. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 12: 2111–2120

Nouaille S., Mondeil S., Finoux A.-L., Moulis C., Girbal L., Coccagn-Bousquet M. (2017) The stability of an mRNA is influenced by its concentration: a potential physical mechanism to regulate gene expression. *Nucleic Acids Research*, 45(20): 11711–11724

Pang Z., Wang G., Gibson P., Guan X., Zhang W., Zheng R., Chen F., Wang Z., Wang F. (2019) Airway microbiome in different inflammatory phenotypes of asthma: a cross-sectional study in Northeast China. *International Journal of Medical Sciences*, 16(3): 477–485

Patnaik S. K., Cortes E. G., Kannisto E. D., Punnanitinont A., Dhillon S. S., Liu S., Yendamuri S. (2021) Lower airway bacterial microbiome may influence recurrence after resection of early-stage non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 161(2): 419–429.e16

Pérez-Losada M., Alamri L., Crandall K. A., Freishtat R. J. (2017) Nasopharyngeal microbiome diversity changes over time in children with asthma. *PLoS One*, 12(1): e0170543

Pérez-Losada M., Authelet K. J., Hoptay C. E., Kwak C., Crandall K. A., Freishtat R. J. (2018) Pediatric asthma comprises different phenotypic clusters with unique nasal microbiotas. *Microbiome*, 6(1): 179

Pérez-Losada M., Castro-Nallar E., Bendall M. L., Freishtat R. J., Crandall K. A. (2015) Dual transcriptomic profiling of host and microbiota during health and disease in pediatric asthma. *PLoS One*, 10(6): e0131819

Peters B. A., Hayes R. B., Goparaju C., Reid C., Pass H. I., Ahn J. (2019) The microbiome in lung cancer tissue and recurrence-free survival. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 28(4): 731–740

Pragman A. A., Lyu T., Baller J. A., Gould T. J., Kelly R. F., Reilly C. S., Isaacson R. E., Wendt C. H. (2018) The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome*, 6(1): 7

Ramírez-Labrada A. G., Isla D., Artal A., Arias M., Rezusta A., Pardo J., Galvez E. M. (2020) The influence of lung microbiota on lung carcinogenesis, immunity, and immunotherapy. *Trends in Cancer*, 6(2): 86–97

Ren L., Zhang R., Rao J., Xiao Y., Zhang Z., Yang B., Cao D., Zhong H., Ning P., Shang Y., Li M., Gao Z., Wang J. (2018) Transcriptionally active lung microbiome and its association with bacterial biomass and host inflammatory status. *mSystems*, 3(5): e00199–18

Segal L. N., Blaser M. J. (2014) A brave new world: the lung microbiota in an era of change. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(suppl. 1): S 21–S 27

Semmouri I., De Schamphelaere K. A. C., Mees J., Janssen C. R., Asselman J. (2020) Evaluating the potential of direct RNA nanopore sequencing: Metatranscriptomics highlights possible seasonal differences in a marine pelagic crustacean zooplankton community. *Marine Environmental Research*, 153: 104836

Shaikh F. Y., Gills J. J., Sears C. L. (2019) Impact of the microbiome on checkpoint inhibitor treatment in patients with non-small cell lung cancer and melanoma. *EBioMedicine*, 48: 642–647

Sharma A., Laxman B., Naureckas E. T., Hogarth D. K., Sperling A. I., Solway J., Ober C., Gilbert J. A., White S. R. (2019) Associations between fungal and bacterial microbiota of airways and asthma endotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(5): 1214–1227.e7

Su J., Liu H.-Y., Tan X.-L., Ji Y., Jiang Y.-X., Prabhakar M., Rong Z., Zhou H.-W., Zhang G.-X. (2015) Sputum bacterial and fungal dynamics during exacerbations of severe COPD. *PLoS One*, 10(7): e0130736

Teo S. M., Mok D., Pham K., Kusel M., Serralha M., Troy N., Holt B. J., Hales B. J., Walker M. L., Hollams E., Bochkov Yu. A., Grindle K., Johnson S. L., Gern J. E., Sly P. D., Holt P. G., Holt K. E., Inouye M. (2015) The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host and Microbe*, 17(5): 704–715

Thorsen J., Rasmussen M. A., Waage J., Mortensen M., Brejnrod A., Bønnelykke K., Chawes B. L., Brix S., Sorensen S. J., Stokholm J., Busgaard H. (2019) Infant airway microbiota and topical immune perturbations in the origins of childhood asthma. *Nature Communications*, 10(1): 5001

Větrovský T., Baldrian P. (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*, 8(2): e57923

Wang Z., Liu H., Wang F., Yang Y., Wang X., Chen B., Stampfli M. R., Zhou H., Shu W., Brightling C. E., Liang Z., Chen R. (2020a) A refined view of airway microbiome in chronic obstructive pulmonary disease at species and strain-levels. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1758

Wang Z., Yang Y., Yan Z., Liu H., Chen B., Liang Z., Wang F., Miller B. E., Tal-Singer R., Yi X., Li J., Stampfli M. R., Zhou H., Brightling C. E., Brown J. R., Wu M., Chen R., Shu W. (2020b) Multi-omic meta-analysis identifies functional signatures of airway microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *ISME Journal*, 14(11): 2748–2765

Wang B., Yao M., Lv L., Ling Z., Li L. (2017) The human microbiota in health and disease. *Engineering*, 3(1): 71–82

Warris A. (2019) Immunopathology of *Aspergillus* infections in children with chronic granulomatous disease and cystic fibrosis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 38(5): E 96–E 98

Westreich S. T., Korf I., Mills D. A., Lemay D. G. (2016) SAMSA: a comprehensive metatranscriptome analysis pipeline. *BMC Bioinformatics*, 17(1): 399

Westreich S. T., Treiber M. L., Mills D. A., Korf I., Lemay D. G. (2018) SAMSA2: a standalone metatranscriptome analysis pipeline. *BMC Bioinformatics*, 19(1): 175

Wood D. E., Salzberg S. L. (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15(3): R 46

Xu N., Wang L., Li C., Ding C., Li C., Fan W., Cheng C., Gu B. (2020) Microbiota dysbiosis in lung cancer: evidence of association and potential mechanisms. *Translational Lung Cancer Research*, 9(4): 1554–1568

Zhang W., Luo J., Dong X., Zhao S., Hao Y., Peng C., Shi H., Zhou Y., Shan L., Sun Q., Li Y., Zhao X. (2019) Salivary microbial dysbiosis is associated with systemic inflammatory markers and predicted oral metabolites in non-small cell lung cancer patients. *Journal of Cancer*, 10(7): 1651–1662

Zhou Y., Jackson D., Bacharier L. B., Mauger D., Boushey H., Castro M., Durack J., Huang Y., Lemanske R. F. Jr, Storch G. A., Weinstock G. M., Wylie K., Covar R., Fitzpatrick A. M., Phipatanakul W., Robison R. G., Beigelman A. (2019) The upper-airway microbiota and loss of asthma control among asthmatic children. *Nature Communications*, 10(1): 5714

DOI 10.17516/1997-1389-0396

EDN: WMFQZE

УДК 579.61

A New Method for Treating Burn Wounds Using Targeted Delivery of Medicinal Substances by Magnetic Nanocarrier (Experimental Part)

**Alexander A. Bogatikov^a, Konstantin G. Dobretsov^f,
Marina V. Melikhova^b, Mikhail A. Rozhko^b,
Natalia V. Lapina^b, Sergey V. Stolyar^c,
Roman N. Yaroslavtsev^c, Oleg A. Bayukov^c,
Anna V. Tyumentseva^c, Elena D. Nikolaeva^{c*},
Ekaterina S. Tyutrina^{c, d} and Evgenii V. Zinovev^e**

*^aL.G. Sokolov North-West Regional Scientific
and Clinical Center of the Federal Medical-Biological Agency
St. Petersburg, Russian Federation*

*^bInstitute of Toxicology of the Federal Medical-Biological Agency
St. Petersburg, Russian Federation*

*^cFederal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS”
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^dProf. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^eI. I. Dzhanelidze Saint-Petersburg Research Institute
of Emergency Medicine
St. Petersburg, Russian Federation*

*^fRussian State Social University
Moscow, Russian Federation*

Received 17.03.2021, received in revised form 13.07.2021, accepted 17.11.2021

Abstract. Experimental studies have been carried out on laboratory animals to investigate the effectiveness of targeted delivery of levomekol ointment using magnetic nanoparticles and an external magnetic field for treatment of thermal burns. The study involved 20 rats, with two burns on each. The rats were divided

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: nikolaeva-lena@mail.ru

ORCID: 0000-0003-4310-091X (Stolyar S.); 0000-0002-6791-7492 (Yaroslavtsev R.); 0000-0002-2269-0298 (Tyumentseva A.); 0000-0002-5298-828X (Nikolaeva E.); 0000-0002-2493-5498 (Zinovev E.)

into 4 groups: untreated; treated with levomekol ointment; treated with levomekol ointment associated with nanoparticles and an external magnetic field; and treated with magnetic field alone. Histological examination was conducted on Day 14, and in all groups, in the thermal burn zone of the skin there were signs of deep three- and four-degree burns with necrosis spread through the dermis, reaching the muscle. In the group with levomekol ointment associated with nanoparticles and magnetic field, inflammation was decreased, and focal granulation tissue formation was observed. Thus, histological studies of the burn wound process in laboratory animals showed that the use of an innovative biologically active wound healing agent based on nanoparticles in combination with the levomecol ointment improved tissue regeneration and accelerated epithelialization, which enhanced the effectiveness of burn wound treatment. The use of an external magnetic field facilitated targeted delivery of the therapeutic nanosystem and maintenance of the optimal concentration of the drug in the wound.

Keywords: nanoparticles, ferrihydrite, levomekol, magnetic field, wound, burn, wound infection, regeneration, topical therapy.

Acknowledgements. This research was funded by Krasnoyarsk Regional Science Foundation, Competition of projects for organizing the participation of students, graduate students and young scientists in conferences, scientific events and internships (stage II of 2021) (Application code: 2021051707717).

Citation: Bogatikov A.A., Dobretsov K.G., Melikhova M.V., Rozhko M.A., Lapina N.V., Stolyar S.V., Yaroslavtsev R.N., Bayukov O.A., Tyumentseva A.V., Nikolaeva E.D., Tyutrina E.S., Zinovev E.V. A new method for treating burn wounds using targeted delivery of medicinal substances by magnetic nanocarrier (experimental part). *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2022, 15(3), 422–436. DOI: 10.17516/1997-1389-0396



**Новый способ лечения ожоговых ран
с помощью адресной доставки лекарственных веществ
магнитным наноносителем
(экспериментальная часть)**

**А. А. Богатиков^а, К. Г. Добрецов^с, М. В. Мелихова^б,
М. А. Рожко^б, Н. В. Лапина^б, С. В. Столяр^б,
Р. Н. Ярославцев^в, О. А. Баюков^в, А. В. Тюменцева^в,
Е. Д. Николаева^в, Е. С. Тютрина^{в, г}, Е. В. Зиновьев^д**

*^аСеверо-Западный окружной научно-клинический центр
имени Л. Г. Соколова Федерального медико-биологического агентства
Российская Федерация, Санкт-Петербург*

*^бИнститут токсикологии Федерального
медико-биологического агентства
Российская Федерация, Санкт-Петербург*

*^вФедеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск*

*^сКрасноярский государственный медицинский университет
имени проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Российская Федерация, Красноярск*

*^дСанкт-Петербургский научно-исследовательский институт
скорой помощи им. И. И. Джанелидзе
Российская Федерация, Санкт-Петербург*

*^еРоссийский государственный социальный университет
Российская Федерация, Москва*

Аннотация. Проведено экспериментальное исследование на лабораторных животных по изучению эффективности адресной доставки мази левомеколь с помощью магнитных наночастиц и внешнего магнитного поля при термических ожогах. В исследовании принимало участие 20 крыс с двумя очагами ожога. Крысы были разделены на 4 группы: без лечения, терапия с использованием мази левомеколь, лечение с использованием наночастиц, мази левомеколь и внешнего магнитного поля и только магнитотерапии. При гистологическом исследовании на 14-е сутки во всех группах в зоне термического повреждения кожи были отмечены признаки глубокого ожога III и IV степени с распространением некроза на всю глубину дермы и на мышцы. В группе с наночастицами, мазью левомеколь и магнитным полем на фоне уменьшения воспаления отмечалось очаговое появление грануляционной ткани. Таким образом, гистологические исследования ожогового раневого процесса лабораторных животных показали, что использование инновационного биологически активного ранозаживляющего средства на основе наночастиц в сочетании с мазью левомеколь улучшает регенерацию тканей

и приводит к ускорению эпителизации, что в целом повышает результаты лечения ожоговой раны. Использование внешнего магнитного поля способствует адресной доставке лечебного наноконплекса и поддержанию оптимальной концентрации препарата в ране.

Ключевые слова: наночастицы, ферригидрит, левомеколь, магнитное поле, рана, ожог, раневая инфекция, регенерация, местное лечение.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Красноярского краевого фонда науки, Конкурс проектов организации участия студентов, аспирантов и молодых ученых в конференциях, научных мероприятиях и стажировках (II очередь 2021 года) (проект № 2021051707717).

Цитирование: Богатиков А. А. Новый способ лечения ожоговых ран с помощью адресной доставки лекарственных веществ магнитным наноносителем (экспериментальная часть) / А. А. Богатиков, К. Г. Добрецов, М. В. Мелихова, М. А. Рожко, Н. В. Лапина, С. В. Столяр, Р. Н. Ярославцев, О. А. Баюков, А. В. Тюменцева, Е. Д. Николаева, Е. С. Тютрина, Е. В. Зиновьев // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(3). С. 422–436. DOI: 10.17516/1997-1389-0396

Введение

По данным ВОЗ на 2018 год, ожоги занимают 4-е место среди разных видов травм и являются причиной до 180 000 смертей ежегодно; 60–80 % случаев это поверхностные незначительные по площади ожоги, которые нуждаются в консервативном лечении. Инфицирование ожоговых ран становится одной из причин осложнений, длительной госпитализации, и косметических дефектов регенерированной ткани. Главными направлениями консервативного (нехирургического) лечения ожогов являются профилактика и борьба с раневой инфекцией, применение некротических средств, ускоряющих отторжение ожогового струпа, и ранняя активизация процессов заживления ран (Алексеев и др., 2013, 2014). Опыт лечения ожогов показал, что выбор средств и методов местного лечения существенно влияет на продолжительность и на исход лечения (Островский и др., 2014).

Современные подходы к местному лечению ожоговых ран в полной мере не позволяют справиться с развивающейся инфекцией мягких тканей, а также не всегда могут влиять на их регенерацию. Это связа-

но с формированием на поверхности раны биопленки – сообщества микроорганизмов, окруженного внеклеточным матриксом. Резистентность микроорганизмов к антибиотикам внутри биопленок объясняется меньшей биодоступностью препаратов из-за мембраны на поверхности биопленки, разной метаболической активностью бактерий и наличием инактивирующих антибиотики ферментов в составе матрикса. Установлено, что для подавления микроорганизмов в виде биопленок требуются концентрации препаратов, в несколько раз превышающие терапевтические дозы. Кроме того, формирование биопленки на поверхности раны приводит к нарушению трофики тканей и гипоксии. Все это делает актуальным поиск новых средств профилактики формирования и лечения бактериальных инфекций на поверхности ран.

Одним из перспективных методов лечения раневых процессов стало использование наночастиц. Чаще всего используются наночастицы серебра, в меньшей степени золота, меди, а также наночастицы оксида титана и цинка (Albanese et al., 2012). На сегодняшний день продолжается поиск оптимальных

наночастиц, которые бы не обладали токсическим действием.

Наночастицы на основе оксидов железа показали биосовместимость и безопасность, вовлечение в метаболизм и способность к выведению из организма. Например, наночастицы из магнетита проявляют минимальную цитотоксичность по сравнению с ZnO, TiO₂, CuO или Ag₂O (Vasilichin et al., 2020; Dusek et al., 2013; Chee et al., 2018; Vangijzegem et al., 2019).

Наночастицы ферригидрита – перспективный материал для использования в биомедицине благодаря своей высокой биосовместимости. Это обусловлено тем, что ферригидрит входит в состав белкового комплекса ферритина, представляющего собой капсулу из белка апоферритина с депонированным соединением железа внутри. Магнитные свойства, структура и возможные применения наночастиц ферригидрита исследованы в работах (Seehra et al., 2000; Punnoose et al., 2005; Stolyar et al., 2020; Balaev et al., 2017; Chilom et al., 2020a, 2020b).

Наночастицы на основе оксида железа могут быть нагружены лекарственными препаратами и лигандами – биосовместимыми покрытиями, усиливающими способность связываться с живыми клетками. Магнитные наночастицы хорошо подходят для адресной доставки лекарств, при этом внешнее магнитное поле используется как источник внешнего управления (Добрецов и др., 2009b). Целевое введение лекарственных веществ с применением наночастиц в пораженные ткани магнитным наноносителем дает возможность создавать максимальную концентрацию препарата в очаге инфекции с пролонгированным терапевтическим эффектом (Добрецов и др., 2009a).

Положительный противовоспалительный и репаративный эффект применения магнитных частиц ферригидрита отмечен в работах (Добрецов и др., 2009a, b; Van Rijt et al., 2014).

При действии магнитного поля с наночастицами происходит уменьшение гидратации и возрастание ионной активности, что является предпосылкой к стимуляции клеточного метаболизма, а комбинация наночастиц с природными полисахаридами (например, арабиногалактаном) повышает регенерацию тканей (Добрецов и др., 2009a; Никитина и др., 2002; Леонтьев, 2006). Дополнительная нагрузка наночастиц антибактериальным препаратом препятствует возникновению инфекции на поверхности раны. Таким образом, комбинированное применение наночастиц в сочетании с полисахаридом и лекарственным препаратом с использованием магнитного поля может показать наилучший результат в заживлении ожоговой раны.

Целью работы было оценить эффективность инновационного биологически активного ранозаживляющего средства на основе наночастиц с арабиногалактаном и мази левомеколь в лечении ожоговых ран на модели лабораторных животных.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование по изучению эффективности лечения ожоговых ран на лабораторных животных с помощью магнитных наночастиц ферригидрита и внешнего магнитного поля было проведено в Институте токсикологии ФМБА России (Санкт-Петербург). Эксперимент на животных проведен в соответствии с правилами этического обращения с животными и одобрен Локальным этическим комитетом института.

Магнитные наночастицы были получены в ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск) осаждением в растворе гидроксида аммония в условиях ультразвуковой кавитации: к предварительно приготовленному раствору, содержащему 0,4 % нитрата железа Fe(NO₃)₃,

и 0,5 % арабиногалактана, по каплям добавляли раствор гидроксида аммония NH_4OH (2,5 % об.). В процессе синтеза раствор обрабатывали ультразвуком (50 Вт/см², 22 кГц).

Наночастицы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700 (Hitachi, Япония) и мессбауэровского спектрометра MC-1104Em (НИИ физики ЮФУ, Россия) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

На основе полученных наночастиц было изготовлено средство для лечения ран с использованием мази «Левомеколь», которая представляет собой антибактериальное комбинированное средство (40 мг/г диоксометилтетрагидропиримидин + 7,5 мг/г хлорамфеникол) наружного применения с выраженным иммуностимулирующим и противовоспалительным действием, подавляет воспалительный процесс, оказывает ранозаживляющий эффект и запускает регенерационные процессы эпидермиса (производитель АО «Нижфарм», Россия). Соотношение ферроарабиногалактана и левомеколя составило 20 мг вещества/40 г мази.

Модель ожога выполняли на самцах беспородных белых крыс весом 200 г, возраст 6 месяцев. Животным вводили в качестве неингаляционной общей анестезии тиопентал натрия 1 % раствор в дозе 30 мг/кг внутримышечно. После введения анестезии животных тримминговали на площади 10x15 см и затем сразу проводили термический ожог на коже спины.

Для этого эбонитовую площадку с металлической поверхностью и прорезью 1,5x2 см для проведения термического ожога прикладывали к поверхности спины крысы для изоляции поверхности спины от температурного воздействия. На площадку ставили галогенный проектор 150 Вт и включали его

на 10 с сначала на одной стороне спины, а затем, передвинув площадку, на другой. Во время проведения ожога крыса находилась под анестезией. В итоге получалось два участка ожога слева и справа от позвоночника крысы. Площадь каждого ожога составляла 3 см².

Магнитотерапия проводилась аппаратом АМТ-01 (220 В, 50 Гц, 30 Вт), производитель ОАО «Амкодор-Белвар», Беларусь.

Были сформированы 4 группы животных численностью по 5 крыс:

- 1 группа – контрольная, без лечения;
- 2 группа – лечение с использованием мази левомеколь;
- 3 группа – лечение с использованием магнитотерапии и мази левомеколь, ассоциированной с наночастицами;
- 4 группа – лечение с использованием магнитотерапии.

Лечение ожогов проводили через 24 часа после их нанесения на кожу и продолжали в течение 14 дней. Мазь наносилась на ожоговую поверхность дважды в день (утром и вечером). Магнитотерапию проводили после нанесения мази с продолжительностью воздействия 20 мин.

На 15-й день исследования после эвтаназии у крыс брали участки кожи с ожогами для проведения гистологических исследований. Объекты фиксировали в 10 %-ном формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, наблюдение проводили с помощью микроскопа с увеличением в 100 раз, не менее чем в 10 полях зрения.

Дизайн выполненного исследования: пилотное, одномоментное.

Результаты

Результаты исследования методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения наночастиц оксида железа

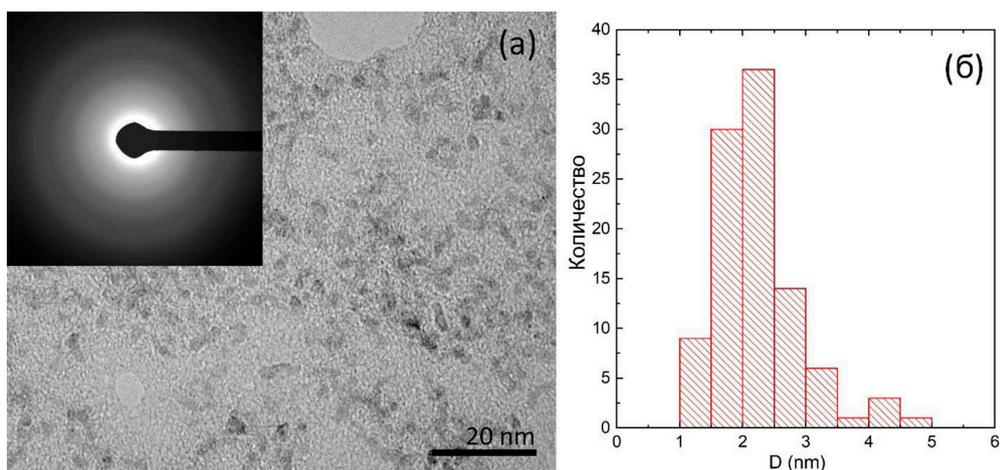


Рис. 1. Изображение наночастиц, полученное с помощью просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения (а) и анализ распределения частиц по размеру (б).

Fig. 1. Image of nanoparticles taken with a high-resolution transmission electron microscope (a) and analysis of particle size distribution (б).

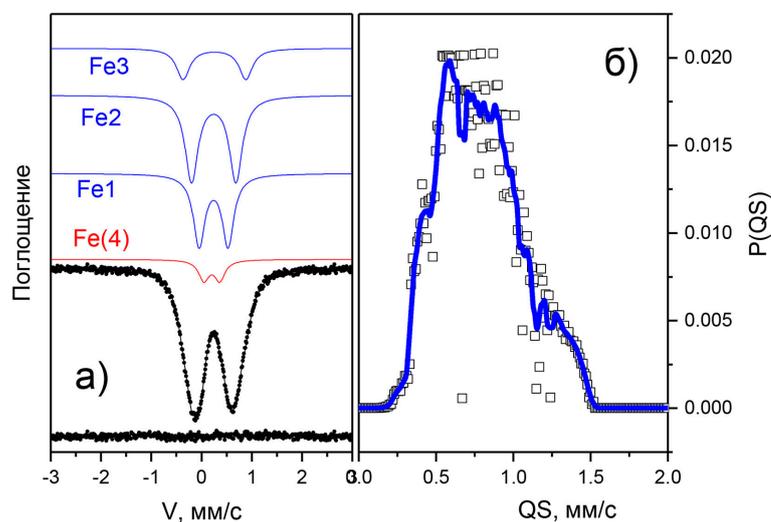


Рис. 2. Мёссбауэровский спектр (а) и распределение квадрупольных расщеплений в образце (б).

Fig. 2. Mössbauer spectrum (a) and distribution of quadrupole splittings in the sample (б).

представлены на рис. 1. Частицы имели сферическую форму, средний размер составлял $\sim 2,17 \pm 0,64$ нм (Balaev et al., 2015, 2016; Stolyar et al., 2017).

На рис. 2а представлен мёссбауэровский спектр наночастиц оксида железа, измеренный при комнатной температуре. Спектр представляет собой квадрупольный дублет,

характерный для разблокированных частиц в суперпарамагнитном состоянии. Анализ распределения квадрупольных расщеплений $P(QS)$ в экспериментальном спектре (рис. 2б) приводит к выводу о наличии, по крайней мере, трех неэквивалентных позиций железа с октаэдрическим окружением и одной позиции с тетраэдрическим окружением лигандов.

Таблица. Мёссбауэровские параметры

Table. Mössbauer parameters

IS	QS	W	A	позиция
0,31	0,32	0,25	0,08	Fe(4)
0,35	0,58	0,28	0,32	Fe1(6)
0,35	0,88	0,31	0,44	Fe2(6)
0,37	1,25	0,32	0,16	Fe3(6)

Модельный спектр (рис. 2а) формировался с учетом особенностей, наблюдаемых на распределении $P(QS)$, и подгонялся к экспериментальным спектрам при варьировании всего набора сверхтонких параметров. Результат расшифровки мёссбауэровских спектров сведен в таблице. Позиции железа, обозначенные Fe1 и Fe2, соответствуют кубической и гексагональной упаковке лигандов, в то время как позиция Fe3 соответствует межслоевым атомам железа (Stolyar et al., 2017).

Параметры модельных спектров наночастиц хорошо согласуются с результатами, полученными ранее на ферригидрите (Balaev et al., 2015, 2016; Murad, Schwertmann, 1980).

В ходе эксперимента у животных были получены ожоги III–IV степени. Спустя 14

дней местной терапии наблюдались следующие результаты.

На 14-е сутки у всех животных 3 группы (лечение с использованием магнитотерапии и мази левомеколь, ассоциированной с наночастицами), явления воспаления были полностью купированы, площадь раневого процесса сократилась на 30 %, по сравнению с контрольной группой (рис. 3).

В первой группе (контрольная, без лечения) наблюдался глубокий дефект раны, прикрытый струпом из некротических масс, с распространением до мышц. В тканях наблюдались очаги воспалительной инфильтрации, грануляции отсутствовали. В краях повреждения поверхностные отделы дермы были с отеком, отслаивались от нижележащих

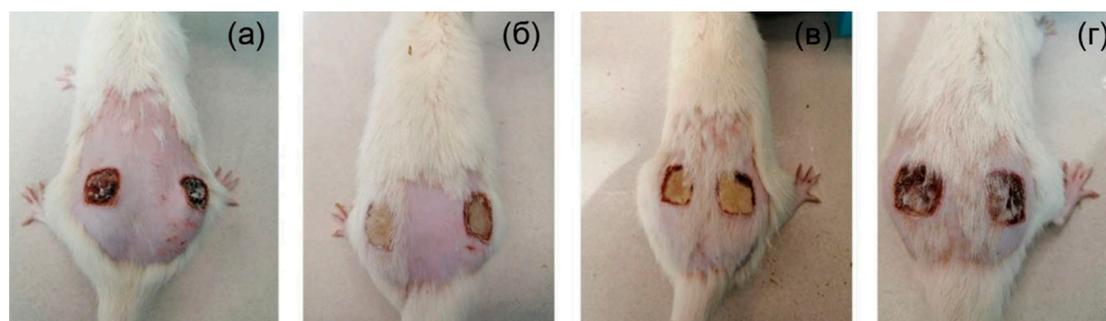


Рис. 3. Фотографии состояния ран на 14-ые сутки после термического воздействия: контрольная группа без лечения (а); группа лечения мазью левомеколь (б); группа лечения с использованием магнитотерапии и мази левомеколь, ассоциированной с наночастицами (в); группа лечения магнитотерапией (г).

Fig. 3. Images of the wounds on Day 14 after burn wound creation: control group without treatment (a); group of treatment with levomekol ointment (б); group of treatment using magnetic field and levomekol ointment associated with nanoparticles (в); magnetic field treatment group (г).

тканей с формированием пузыря до придатков кожи. Эпидермис на границах раны был истончен по сравнению со здоровой кожей (рис. 4). В других участках ожоговой раны многослой-

ный плоский эпителий был сохранен (рис. 5). Признаков регенерации не определялось. Полное самостоятельное (без лечения) восстановление кожи становится невозможным.

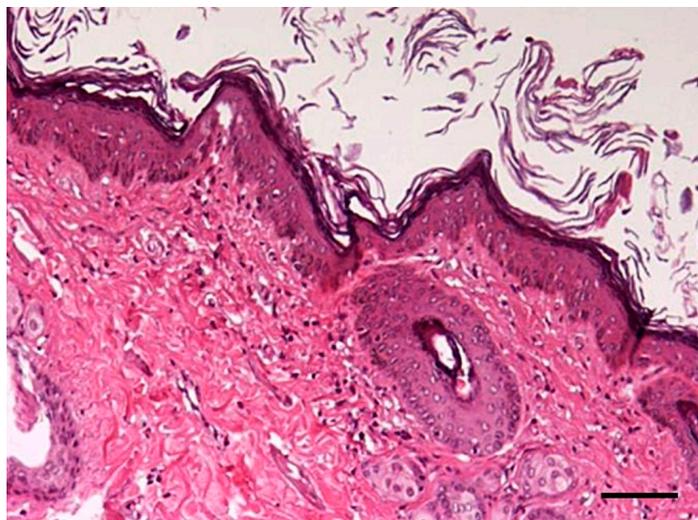


Рис. 4. Здоровая кожа животного. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. Масштабный отрезок 100 мкм.

Fig. 4. Healthy animal skin stained with hematoxylin and eosin. Magnification is $\times 200$. Scale bar is 100 μm .

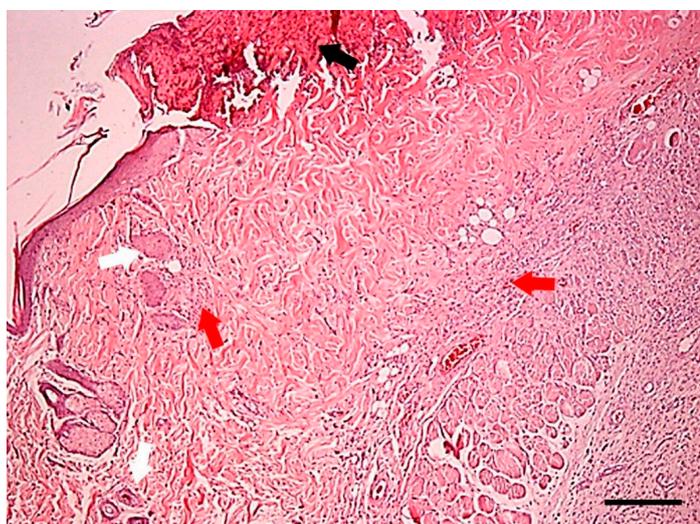


Рис. 5. Кожа в области спины на 14-ые сутки после ожога, группа 1 (контрольная, без лечения). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$. Масштабный отрезок 200 мкм. Черная стрелка – струп. Белые стрелки – остатки кожных придатков. Красные стрелки – очаги воспаления.

Fig. 5. The skin of dorsal region on Day 14 after burn wound creation, Group 1 (control, no treatment), stained with hematoxylin and eosin. Magnification is $\times 100$. Scale bar is 200 μm . Black arrow points at the scab. White arrows point at remnants of skin structures. Red arrows point at inflammation sites.

Во второй группе (использование мази левомеколь), как и в предыдущей группе, определялся раневой дефект до мышечной ткани. Под струпом выявлялся тотальный некроз мышц с отеком стромы. В глубоких отделах определялась слабо выраженная воспалительная инфильтрация. В одном из образцов был единичный очаг грануляции. В краях повреждения граница была четкая, многослойный плоский эпителий неповрежденных тканей был сохранен (рис. 6). Четкие признаки регенерации отсутствовали. Это указывало на то, что применение одной мази левомеколь недостаточно для лечения раневого процесса.

В третьей группе (использование магнитотерапии и мази левомеколь, ассоциированной с наночастицами) определялась отчетливая картина регенеративной стадии раневого процесса – доминирование на поверхности раны грануляционной ткани различной степени зрелости со слабо выраженной воспа-

лительной инфильтрацией. Толщина струпа во всех образцах была в 1,5–2 раза тоньше, чем в группе сравнения. Струп был более тонкий, при его отхождении ткань не кровоточила. Таким образом, визуальная картина ран лабораторных животных группы 3 на 14-е сутки соответствовала регенеративному периоду раневого процесса (рис. 7). Частичная грануляция значительно ускоряет регенерацию и эпителизацию тканей. Это позволяет использовать раннюю аутодермопластику, а также приводит к заживлению раны без формирования коллоидного рубца.

В четвертой группе (использование магнитного поля) дефект кожи распространялся до мышц, был, как и в других группах, прикрыт струпом из некротических масс. В половине наблюдений под слоем струпа определялось разрастание обильно созревающей грануляционной ткани и диффузно воспалительной инфильтрации, что приводит к формированию грубой рубцовой ткани (рис. 8).

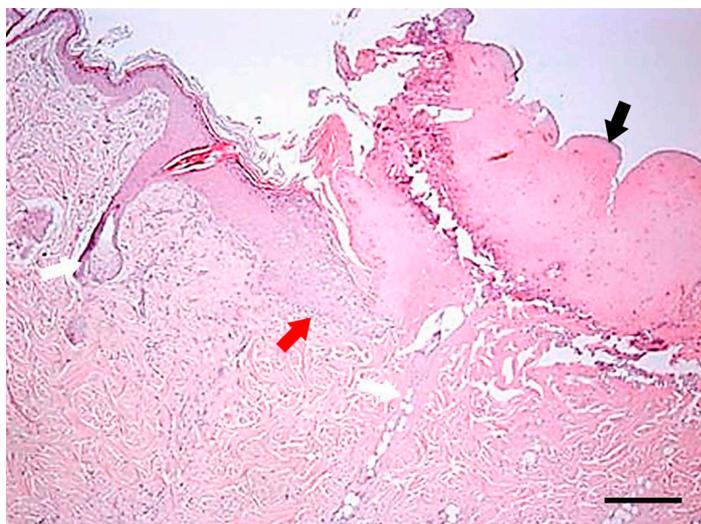


Рис. 6. Кожа в области спины на 14-ые сутки после ожога, группа 2 (лечение мазью левомеколь). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$. Масштабный отрезок 200 мкм. Черная стрелка – струп. Красная стрелка – воспалительный инфильтрат. Белые стрелки – остатки кожных придатков.

Fig. 6. The skin of dorsal region on Day 14 after burn wound creation, Group 2 (treatment with levomekol ointment), stained with hematoxylin and eosin. Magnification is $\times 100$. Scale bar is 200 μm . Black arrow points at the scab. Red arrow points at inflammatory infiltrate. White arrows point at remnants of skin structures.

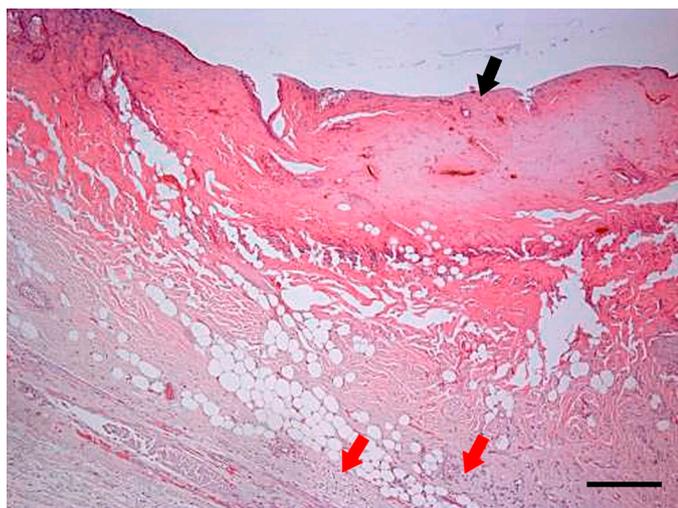


Рис. 7. Кожа в области спины на 14-ые сутки после ожога, группа 3 (лечение с использованием магнитотерапии и мази левомеколь, ассоциированной с наночастицами). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$. Масштабный отрезок 200 мкм. Черная стрелка – струп, красные стрелки – области грануляции.

Fig. 7. The skin of dorsal region on Day 14 after burn wound creation, Group 3 (treatment using magnetic field and levomekol ointment associated with nanoparticles), stained with hematoxylin and eosin. Magnification is $\times 100$. Scale bar is 200 μm . Black arrow points at the scab, red arrows point at areas of granulation.

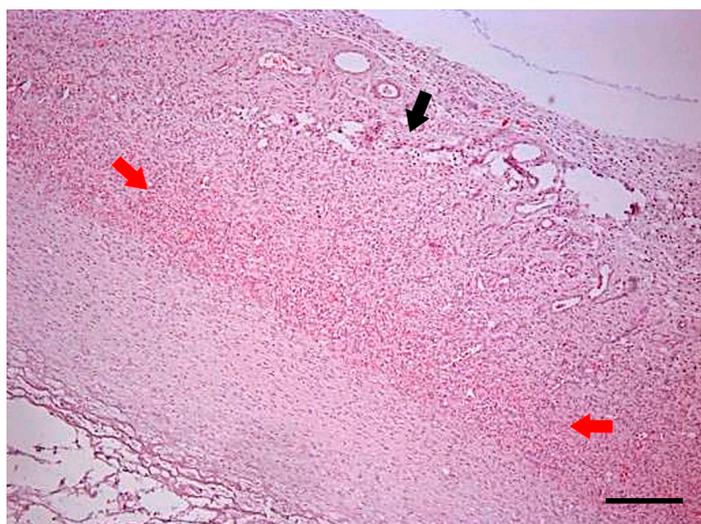


Рис. 8. Кожа в области спины на 14-ые сутки после ожога, группа 4 (лечение магнитотерапией). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$. Масштабный отрезок 200 мкм. Красные стрелки – зона грануляции, черная стрелка – воспалительный инфильтрат.

Fig. 8. The skin of dorsal region on Day 14 after burn wound creation, Group 4 (treatment with magnetic field), stained with hematoxylin and eosin. Magnification is $\times 100$. Scale bar is 200 μm . Red arrows point at granulation zone, black arrow points at inflammatory infiltrate.

Гипергрануляция способствует формированию бугристого наложения соединительной ткани и приводит к распространению воспалительного процесса.

Обсуждение

Взаимодействие наночастиц и живых объектов зависит от целой комбинации параметров, таких как состав, размер, форма, поверхностный заряд наночастиц, и типа живых клеток, с которыми наночастицы взаимодействуют. Так, например, наиболее чувствительными к воздействию наночастиц одинакового состава, размера и формы являются макрофаги, наименее – раковые клетки (Reneg-Lescuna et al., 2019). В зависимости от размера и формы наночастицы либо связываются с поверхностными рецепторами, вызывая изменения в сигнальных каскадных клеточных путях, либо, связываясь с рецепторами, проникают внутрь клетки, подвергаясь эндо- и экзоцитозу, либо встраиваясь в клеточные органеллы (Albanese et al., 2012). В большой степени реакция клеток зависит и от лиганда, в данном случае – арабиногалактана, который взаимодействует с поверхностными клеточными рецепторами. Арабиногалактан способен стимулировать естественные клетки-киллеры, макрофаги и секрецию провоспалительных цитокинов, а также оказывать иммуностимулирующий эффект на организм в целом (Dion et al., 2016).

В нашей работе полученные наночастицы из ферригидрита и арабиногалактана размером 2 нм не вызвали развития воспалительной реакции или токсичного действия на клетки, выстилающие раневое ложе, а также в целом на испытуемое животное. При этом действие наночастиц (группа 3) активнее стимулировало формирование грануляционной ткани по сравнению с действием

только мази левомеколь (группа 2), которая оказывает регенерирующее действие за счет входящего в состав метилурацила. Это можно объяснить тем, что арабиногалактан стимулирует макрофаги и Т-лимфоциты на стадии воспаления, которые в свою очередь стимулируют фибробласты, кератиноциты и ангиогенез на пролиферативной стадии заживления раны (Dion et al., 2016; Burgalassi et al., 2011; Zippel et al., 2009).

Гистологические исследования ожогового раневого процесса лабораторных животных в группе комбинированного применения наночастиц из ферригидрита и арабиногалактана и мази левомеколь показали, что использование инновационного биологически активного ранозаживляющего средства улучшает регенерацию тканей и приводит к ускорению эпителизации, что в целом повышает результаты лечения ожоговой раны. Использование внешнего магнитного поля способствует адресной доставке лечебного наноконцентра и поддержанию оптимальной концентрации препарата в ране.

Заключение

Проведено экспериментальное исследование на лабораторных животных по изучению эффективности адресной доставки мази левомеколь с помощью магнитных наночастиц и внешнего магнитного поля при термических ожогах. Гистологические исследования ожогового раневого процесса лабораторных животных показали, что в группе животных, подвергшихся лечению комбинированным препаратом мази левомеколь с наночастицами и магнитного поля, отмечалось очаговое появление грануляционной ткани на фоне уменьшения воспаления.

Таким образом, использование инновационного биологически активного ранозаживляющего средства на основе наночастиц

в сочетании с мазью левомеколь улучшает регенерацию тканей и приводит к ускорению эпителизации, что в целом повышает результаты лечения ожоговой раны. Полученные результаты дают основание для продолжения работы с целью экспериментального и клинического подтверждения ожидаемой эффективности и безопасности разработанного средства в лечении различных ран в клинике.

Список литературы / References

Алексеев А. А., Бобровников А. Э., Крутиков М. Г., Тюрников Ю. И., Богданов С. Б. (2014) *Местное консервативное лечение ран на этапах оказания помощи пострадавшим от ожогов: клинические рекомендации*. Москва, Общероссийская общественная организация «Объединение комбустиологов «Мир без ожогов», 22 с. [Alekseev A. A., Bobrovnikov A. E., Krutikov M. G., Tyurnikov Y. I., Bogdanov S. B. (2014) *Local conservative treatment of wounds at the stages of care for burn victims. Clinical guidelines*. Moscow, All-Russian public organization “Association of combustiologists “World without burns”, 22 p. (in Russian)]

Алексеев А. А., Бобровников А. Э., Хунафин С. Н. (2013) Лечение поверхностных и пограничных ожоговых ран с применением современных раневых повязок. *Медицинский вестник Башкортостана*, 8(3): 25–30 [Alekseev A. A., Bobrovnikov A. E., Khunafin S. N. (2013) Treatment of superficial and borderline burn wounds by application of modern wound dressings. *Bashkortostan Medical Journal* [Medicinskiy vestnik Bashkorkostana], 8(3): 25–30 (in Russian)]

Добрецов К. Г., Афонькин В. Ю., Столяр С. В., Ладыгина В. П., Сипкин А. В., Лопатин А. С. (2009а) Опыт применения магнитных наночастиц в медицине и перспективы их использования в оториноларингологии. *Вестник оториноларингологии*, 2: 69–71 [Dobretsov K. G., Afon'kin V. I., Stoliar S. V., Ladygina V. P., Sipkin A. V., Lopatin A. S. (2009a) Experience with the use of magnetic nanoparticles in medicine and prospects for their application in otorhinolaryngology. *Vestnik otorinolaringologii*, 2: 69–71 (in Russian)]

Добрецов К. Г., Афонькин В. Ю., Столяр С. В., Ладыгина В. П., Сипкин А. В., Пуртов К. В., Баюков О. А., Коленчукова О. А., Лопатин А. С. (2009б) Клиническое обоснование использования наночастиц в лечении воспалительных процессов носа и околоносовых пазух. *Российская ринология*, 17(2): 29–30 [Dobretsov K. G., Afonkin V. Y., Stolyar S. V., Ladygina V. P., Sipkin A. V., Purtov K. V., Bayukov O. A., Kolenchukova O. A., Lopatin A. S. (2009b) Clinical rationale for the use of nanoparticles in the treatment of inflammatory processes in the nose and paranasal sinuses. *Russian Rhinology* [Rossiyskaya rinologiya], 17(2): 29–30 (in Russian)]

Леонтьев А. Е. (2006) *Влияние переменного магнитного поля на заживление послеоперационных ран. Кандидатская диссертация*. Нижний Новгород, 157 с. [Leontyev A. E. (2006) *The effect of an alternating magnetic field on the healing of postoperative wounds. PhD thesis*. Nizhny Novgorod, 157 p. (in Russian)]

Никитина В. В., Скоромец А. А., Онищенко Л. С. (2002) Сравнительный анализ влияния магнитных полей различных интенсивностей в эксперименте. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*, 3: 34–35 [Nikitina V. V., Skoromets A. A., Onishchenko L. S. (2002) Comparative analysis of the effects of magnetic fields of different intensities in the experiment. *Issues of balneology, physiotherapy and physical therapy* [Voprosi kurortologii, fisioterapii i lechebnoy fisicheskoy kulturi], 3: 34–35 (in Russian)]

Островский Н. В., Петров В. В., Быстрова А. С., Мусацкова М. В. (2014) Сравнительная оценка влияния лекарственных средств для местного лечения ран на заживление термических ожогов II–III степени в эксперименте. *Фундаментальные исследования*, 6: 512–515 [Ostrovskiy N. V., Petrov V. V., Bystrova A. S., Musatskova M. V. (2014) Comparative estimation of medical preparation influence to thermal burns of II and III degrees healing in experiment for local treatment of wounds. *Fundamental Research* [Fundamentalnie issledovaniya], 6: 512–515 (in Russian)]

Albanese A., Tang P. S., Chan W. C. W. (2012) The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14: 1–16

Balaev D. A., Krasikov A. A., Dubrovskii A. A., Bayukov O. A., Stolyar S. V., Iskhakov R. S., Ladygina V. P., Yaroslavtsev R. N. (2015) The effect of low-temperature heat treatment on the magnetic properties of biogenic ferrihydrite nanoparticles. *Technical Physics Letters*, 41(7): 705–709

Balaev D. A., Krasikov A. A., Dubrovskiy A. A., Popkov S. I., Stolyar S. V., Bayukov O. A., Iskhakov R. S., Ladygina V. P., Yaroslavtsev R. N. (2016) Magnetic properties of heat treated bacterial ferrihydrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 410: 171–180

Balaev D. A., Popkov S. I., Krasikov A. A., Balaev A. D., Dubrovskiy A. A., Stolyar S. V., Yaroslavtsev R. N., Ladygina V. P., Iskhakov R. S. (2017) Temperature behavior of the antiferromagnetic susceptibility of nanoferrhydrite from the measurements of the magnetization curves in fields of up to 250 kOe. *Physics of the Solid State*, 59(10): 1940–1946

Burgalassi S., Nicosia N., Monti D., Falcone G., Boldrini E., Fabiani O., Lenzi C., Pirone A., Chetoni P. (2011) Arabinogalactan as active compound in the management of corneal wounds: in vitro toxicity and in vivo investigations on rabbits. *Current Eye Research*, 36(1): 21–28

Chee C. F., Leo B. F., Lai C. W. (2018) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*. Inamuddin D., Asiri A. M., Mohammad A. (eds.) Elsevier Inc., p. 861–903

Chilom C. G., Sandu N., Bălăşoiu M., Yaroslavtsev R. N., Stolyar S. V., Rogachev A. V. (2020a) Ferrihydrite nanoparticles insights: Structural characterization, lactate dehydrogenase binding and virtual screening assay. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164: 3559–3567

Chilom C. G., Zorilă B., Bacalum M., Bălăşoiu M., Yaroslavtsev R., Stolyar S. V., Tyutyunnikov S. (2020b) Ferrihydrite nanoparticles interaction with model lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 226: 104851

Dion C., Chappuis E., Ripoll C. (2016) Does larch arabinogalactan enhance immune function? A review of mechanistic and clinical trials. *Nutrition and Metabolism*, 13(1): 86

Dusek P., Dezortova M., Wuerfel J. (2013) Imaging of Iron. *International Review of Neurobiology*, 110: 195–239

Murad E., Schwertmann U. (1980) The Möessbauer spectrum of ferrihydrite and its relations to those of other iron oxides. *American Mineralogist*, 65(9–10): 1044–1049

Punnoose A., Seehra M. S., van Tol J., Brunel L. C. (2005) High-frequency electron magnetic resonance and magnetic studies of ferrihydrite nanoparticles and evidence of a phase transition. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 288: 168–172

Renero-Lecuna C., Iturrioz-Rodríguez N., González-Lavado E., Padín-González E., Navarro-Palomares E., Valdivia-Fernández L., García-Hevia L., Fanarraga M. L., González-Legarreta L. (2019)

Effect of size, shape, and composition on the interaction of different nanomaterials with HeLa cells. *Journal of Nanomaterials*, 2019: 7518482

Seehra M. S., Babu V. S., Manivannan A., Lynn J. W. (2000) Neutron scattering and magnetic studies of ferrihydrite nanoparticles *Physical Review B – Condensed Matter and Materials Physics*, 61(5): 3513–3518

Stolyar S. V., Yaroslavtsev R. N., Iskhakov R. S., Bayukov O. A., Balaev D. A., Dubrovskii A. A., Krasikov A. A., Ladygina V. P., Vorotynov A. M., Volochaev M. N. (2017) Magnetic and resonance properties of ferrihydrite nanoparticles doped with cobalt. *Physics of the Solid State*, 59(3): 555–563

Stolyar S. V., Balaev D. A., Ladygina V. P., Pankrats A. I., Yaroslavtsev R. N., Velikanov D. A., Iskhakov R. S. (2020) Ferromagnetic resonance study of biogenic ferrihydrite nanoparticles: spin-glass state of surface spins. *JETP Letters*, 111(3): 183–187

Vangijzegem T., Stanicki D., Laurent S. (2019) Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(1): 69–78

Van Rijt S. H., Bein T., Meiners S. (2014) Medical nanoparticles for next generation drug delivery to the lungs. *European Respiratory Journal*, 44(3): 765–774

Vasilichin V. A., Tsymbal S. A., Fakhardo A. F., Anastasova E. I., Marchenko A. S., Shtil A. A., Vinogradov V. V., Koshel E. I. (2020) Effects of metal oxide nanoparticles on toll-like receptor mRNAs in human monocytes. *Nanomaterials*, 10(1): 127

Zippel J., Deters A., Hensel A. (2009) Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3): 391–396