



eISSN 2311-2468
Том 4, № 24. 2016
Vol. 4, no. 24. 2016

электронное периодическое издание
для студентов и аспирантов

Огарёв-онлайн Ogarev-online

<https://journal.mrsu.ru>



ЕГОРОВА М. В.

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНОВ КОРЫ
ПОЛУШАРИЙ МОЗЖЕЧКА ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АЦЕТАТА СВИНЦА¹**

Аннотация. В работе представлены данные морфологического исследования нейронов коры полушарий мозжечка головного мозга половозрелых белых крыс-самцов в норме и при воздействии ацетата свинца. Показаны citoархитектонические особенности слоев коры полушарий мозжечка при действии ацетата свинца.

Ключевые слова: кора мозжечка, нейрон, citoархитектоника, ацетат свинца.

EGOROVA M. V.

**MORPHOLOGICAL FEATURES OF CEREBELLAR CORTEX NEURONS
OF THE BRAIN OF WHITE RATS UNDER THE INFLUENCE OF LEAD ACETATE**

Abstract. The paper includes a morphological analysis of the cerebellar cortex neurons of the brain of sexually mature white male rats in norm and under the influence of lead acetate. The study shows the cytoarchitectonic features of the cerebellar cortex layers under the influence of lead acetate.

Keywords: cerebellar cortex, neuron, cytoarchitectonics, lead acetate.

Токсическое действие соединений свинца является причиной развития патологических состояний нервной системы, в частности, головного мозга. Одной из структур головного мозга, быстро реагирующих на действие свинецсодержащих соединений, является мозжечок [13]. Кора мозжечка головного мозга человека и животных в норме и при различных патологических состояниях продолжает интенсивно изучаться [3; 4; 10; 12]. Однако работы, посвященные изучению структуры коры мозжечка, содержат спорные положения, требующие своего разрешения. Сведений о влиянии свинца и его солей на строение коры мозжечка в постнатальном онтогенезе в доступной печати недостаточно [5–8].

Целью исследования явилось изучение морфологических особенностей нейронов коры полушарий мозжечка головного мозга половозрелых белых крыс при воздействии ацетата свинца.

¹ Исследование выполнено в рамках Программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК») при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере на 2015-2017 гг. (проект «Исследование структурных преобразований мозжечка головного мозга белой крысы в постнатальном онтогенезе при воздействии ацетата свинца»).

Материалы и методы исследования. В работе использовали половозрелых белых беспородных крыс-самцов массой 200-250 г. Эксперимент произведен на 20 животных. В соответствии с поставленными задачами животные разбивались на две группы. Контрольную группу составили 10 особей. Опытную группу составили 10 особей, получавших в течение 7 дней перорально ацетат свинца $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$ в дозе 45 мг/кг/сутки. Животные забивались путем декапитации под наркозом эфира с хлороформом с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных [1].

Материалом для исследования служили участки коры полушарий мозжечка головного мозга белых крыс.

Для получения материала с полости черепа ножницами срезали кожно-мышечные покровы, обнажая костную ткань. Из черепной коробки мозжечок доставали путем отделения щипцами височной, теменной, лобной, затылочной, носовой, слезной, клиновидной и других костей рассечением твердой мозговой оболочки, серповидной складки и перепончатого мозжечкового намета, удаления паутинной и мягкой мозговых оболочек анатомическими ножницами [7].

Для гистологического исследования мозжечок фиксировали в 10%-ом растворе нейтрального формалина, затем его подвергали промывке в проточной воде, обезвоживанию, путем помещения исследуемого материала в спирты возрастающей концентрации, и заливали в парафин по общепринятой методике. Готовили гистологические срезы толщиной 5-7 мкм, окрашивали их гематоксилин-эозином и исследовали с помощью цифрового микроскопа Axio Imager.M2 (ZEISS, Япония) с программным обеспечением для анализа изображений AxioVision SE64 Rel. 4.8.3 и ZEN 2011. Фотосъемка препаратов производилась при помощи цифровой камеры AxioCam MRc5 (ZEISS, Япония). При обзорной микроскопии оценивали морфологические особенности нейронов коры полушарий мозжечка головного мозга белых крыс в норме и при воздействии ацетата свинца.

Также была вычислена концентрация нейронов по формуле:

$$K = x \times 10^6 / 41500 \times n,$$

где x – количество клеток (не менее 100), n – количество полей зрения (не менее 4), 41500 – площадь каждого поля зрения, $\mu\text{м}^2$ [11].

Результаты исследования и их обсуждение. При цитологическом исследовании коры полушарий мозжечка головного мозга как в контрольной, так и опытной группе были выделены 3 слоя нервных клеток, располагающиеся в следующем порядке: 1. Наружный –

молекулярный; 2. Средний – слой клеток грушевидных нейроцитов; 3. Внутренний – зернистый (рис. 1).

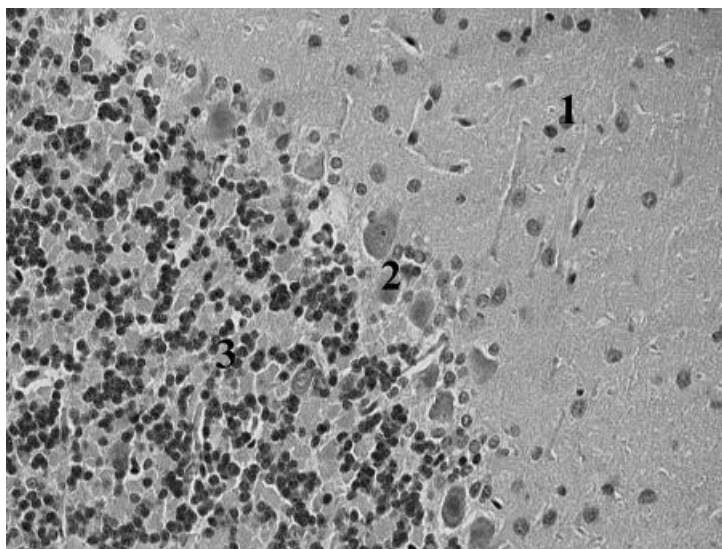


Рис. 1. Кора мозжечка головного мозга белых крыс (контроль). Окраска гематоксилином и эозином. Стрелками обозначены слои нервных клеток (снизу вверх: 1. Наружный – молекулярный; 2. Средний – слой клеток грушевидных нейроцитов; 3. Внутренний – зернистый). Об. 40 × ок. 10.

Проведенные исследования показали различия морфологического строения нейронов коры полушарий мозжечка головного мозга белых крыс контрольной и опытной групп.

В контроле молекулярный слой представлен звездчатыми нейронами, которые располагаются в верхней 2/3 молекулярного слоя, оставшуюся треть заполняют корзинчатые нейроны. Основой объема этого слоя составляют параллельно идущие волокна и разветвления дендритов, аксоны нейронов нижележащих слоев. Корзинчатые нейроны представляют собой перикарионы округлой или полигональной формы с округлыми ядрами с расположенным по центру хорошо заметным ядрышком. Цитоплазма клетки имеет мелкозернистую структуру за счет наличия в ее составе белка. Концентрация нейронов составляла 1204.8 в 1 мкм². Звездчатые нейроны, расположенные у поверхности коры, по размеру меньше корзинчатых нейронов. Они овальной формы, ядро плохо просматривается в результате окраски гематоксилином и эозином. Концентрация нейронов составляет 1084.3 в 1 мкм². (рис. 2).

При воздействии ацетата свинца уменьшается плотность перикарионов молекулярного слоя, а также их объем, возрастает количество глиальных элементов. Слой отличается мелкопористой структурой. Концентрация нейронов уменьшилась на 50% (рис. 3).

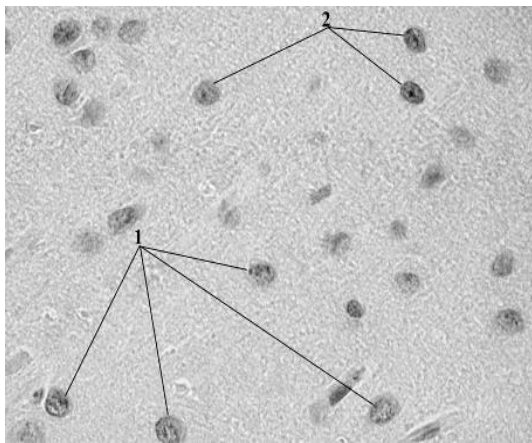


Рис. 2. Молекулярный слой коры мозжечка головного мозга (контроль): 1 – корзинчатые нейроны; 2 – звездчатые нейроны. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 100 × ок. 10.

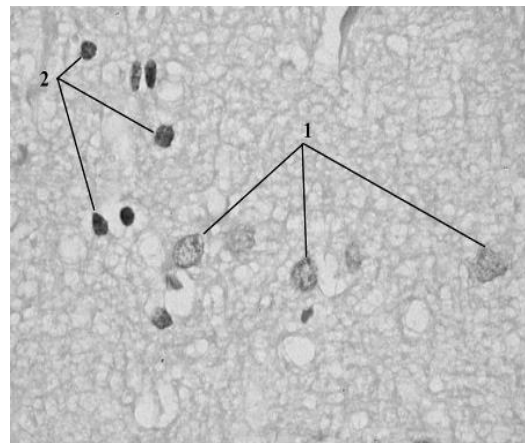


Рис. 3. Молекулярный слой коры мозжечка головного мозга (опыт): 1 – корзинчатые нейроны; 2 – звездчатые нейроны. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 100 × ок. 10.

Слой клеток грушевидных нейроцитов в норме образован клетками Пуркинье – это крупные клетки грушевидной формы с крупным ядром и локализованным в центре ядрышком. Они расположены в два ряда над молекулярным слоем. Цитоплазма клетки имеет крупнозернистую структуру. Нейроны отдалены друг от друга на одинаковое расстояние, ориентированы вертикально по отношению к поверхности коры мозжечка. Концентрация нейронов составляла 597.4 в 1 мкм^2 (рис 4).

При воздействии ацетата свинца в опытной группе в пределах ганглионарного слоя клетки Пуркинье распределены неравномерно, многорядно с эктопией в зернистый слой. Контур перикарионов нечеткий, ядро и цитоплазма имеют трудноразличимые границы. Вокруг нейронов видны участки просветления. Концентрация нейронов уменьшилась на 15% (рис. 5).

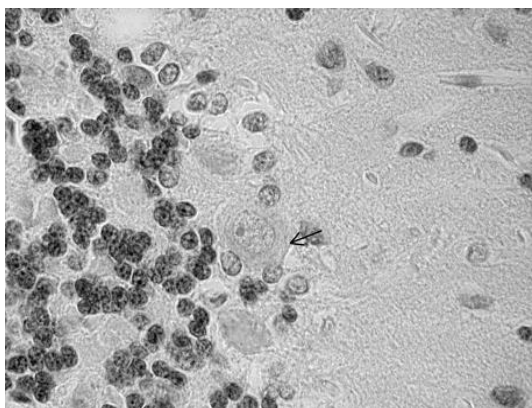


Рис. 4. Слой клеток грушевидных нейроцитов коры мозжечка головного мозга (контроль). Клетки Пуркинье показаны стрелкой. Окраска гематоксилин-эозин. Об. 100 × ок. 10.

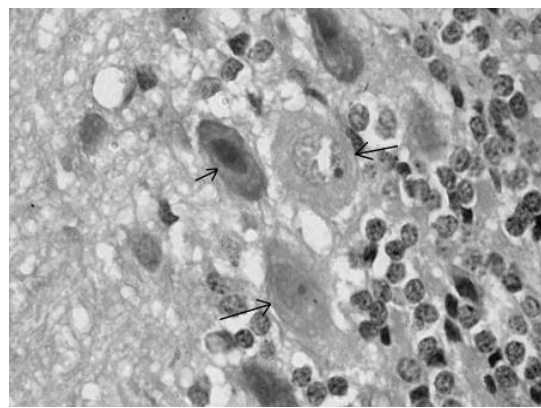


Рис. 5. Слой клеток грушевидных нейроцитов коры мозжечка головного мозга (опыт). Клетки Пуркинье показаны стрелкой. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 100 × ок. 10.

Зернистый слой контрольной группы представлен мелкими нейронами – клетками-зернами овальной формы с крупным круглым ядром, занимающим большую часть клетки, и окружено узким ободком цитоплазмы. Концентрация нейронов составляла 4216.9 в 1 мкм² (рис. 6).

При исследовании зернистого слоя опытной группы животных отмечено уменьшение количества клеток-зерен в связи с миграцией их в молекулярный слой. Концентрация нейронов уменьшилась на 17% (рис. 7).

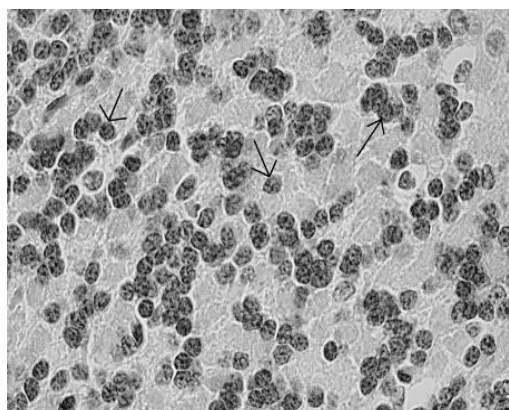


Рис. 6. Зернистый слой коры мозжечка головного мозга (контроль): 1 – клетки-зерна. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 100 × ок. 10.

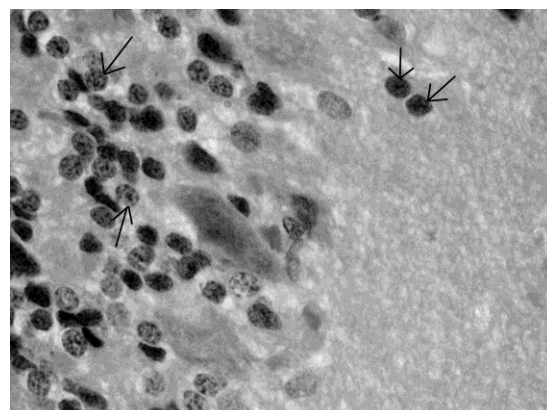


Рис. 7. Зернистый слой коры мозжечка головного мозга (опыт): 1 – клетки-зерна. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 100 × ок. 10.

Таким образом, полученные цитоархитектонические и морфологические данные свидетельствуют о существенном влиянии ацетата свинца на кору полушарий мозжечка головного мозга половозрелых белых крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Еременко И. Р., Васильева Е. В., Рыжавский Б. Я., Демидова О. В. Влияние поступления свинца крысам в молочном периоде на концентрацию липидов в полушариях мозга и мозжечка в препубертатном периоде онтогенеза // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – № 3. – С. 108–111.
3. Ипастова И. Д. Макро- и микроморфология головного мозга и мозжечка белой крысы // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2014. – № 4 (32). – С. 30–35.

4. Ипастова И. Д., Перфильева Н. П. О влиянии димефосфона на морфологию мозжечка белой крысы // Вестник Брянского государственного университета. – 2014. – № 4. – С. 83–88.
5. Калиниченко С. Г. Самоорганизация нейронных систем и модульная архитектура головного мозга // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 8–11.
6. Калюжка В. Ю., Маркевич В.Ю. Сравнительно-анатомическое исследование морфометрических параметров головного мозга и мозжечка у беспородных крыс / Хабаровский государственный университет. – Хабаровск, 2013. – С. 44–45.
7. Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л. Анатомия крысы (Лабораторные животные). – СПб.: Лань, 2001. – 464 с.
8. Орлянская Т. Я., Устинова Т. И., Чижова С. В. Оценка перестроек структур ЦНС молодых животных после воздействия слабыми алкогольными напитками // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 6. – С. 695–698.
9. Рыжавский Б. Я., Васильева Е. В., Соколова Т. В. Морфологические особенности мозжечка потомства крыс-самок, подвергнутых перед беременностью длительному эмоциональному стрессу // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 136. – № 2. – С. 235–238.
10. Рыжавский Б. Я., Лебедько О. А., Еременко И. Р., Васильева Е. В., Демидова О. В. Влияние свинца в молочном периоде онтогенеза на морфометрические, гистохимические и биохимические показатели развития головного мозга // Дальневосточный медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 98–105.
11. Углов Б. А., Котельников Г. П., Углова С. М. Статистический анализ и математическое моделирование в медико-биологических исследованиях. – Самара: Самарский Дом печати, 1994. – 67 с.
12. Узбеков М. В. Активность супероксиддисмутазы в мозге потомства крыс при антенальном воздействии свинца // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – Т. 128. – № 12. – С. 667–669.
13. Fonnum F., Lock E. A. Cerebellum as a target for toxic substances // Toxicology Letters. – 2000. – Vol. 112-113. – P. 9-16.
14. Hanz S., Fainzilber M. Integration of retrograde axonal and nuclear transport mechanisms in neurons: implications for therapeutics // Neuroscientist. – 2004. – Vol. 10. – No. 5. – P. 404–408.

КОНСТАНТИНОВ К. Н., НИЖЕГОРОВОДА Т. С., ПЕСТОВ Н. А.
ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ
АЛЬФА-ФАЗЫ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Аннотация. Проведено исследование влияния условий биосинтеза бактериальной целлюлозы на содержание α -фазы в этом биополимере. Показано, что, в отличие от уровня биосинтеза бактериальной целлюлозы, изменения условий культивирования продуцента этого биополимера не приводят к изменению соотношения α - и β -фаз в бактериальной целлюлозе.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, альфа-фаза, инфракрасная спектроскопия, биосинтез, условия культивирования.

KONSTANTINOV K. N., NIZHEGORODOVA T. S., PESTOV N. A.
THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS
ON ALPHA-PHASE OF BACTERIAL CELLULOSE

Abstract. The article includes a study results of the effect of bacterial cellulose biosynthesis conditions on the level of α -form in this biopolymer. It was shown that unlike the level of bacterial cellulose biosynthesis, the changes of cultivation conditions of the bacterial cellulose producer did not change of the ratio between α - and β -phases in bacterial cellulose.

Keywords: bacterial cellulose, alpha-phase, infrared spectroscopy, biosynthesis, culture conditions.

Химически модифицированные нанопибриллы бактериальной целлюлозы могут найти широкое применение в нанотехнологии, например, в качестве микроскопических электродов [3]. Природная целлюлоза I имеет две полиморфные модификации – α - и β -формы целлюлозы [1]. Считается, что I α -целлюлоза метастабильна и, соответственно, обладает более высокой реакционной способностью по сравнению с I β -формой целлюлозы. Вследствие этого I α -целлюлоза будет являться участком первичной реакции, и соответственно, преобладание α формы в целлюлозе позволило бы проводить химическую модификацию целлюлозы в более мягких условиях. Показано, что наивысший процент I α -фазы (~70%) имеет бактериальная целлюлоза. Yamamoto и Horii [5] обнаружили, что доля целлюлозы I α варьируется от 64% в целлюлозе валония и бактериальной целлюлозе до 20% в рами и хлопковой. Условия культивирования продуцента бактериальной целлюлозы могут значительно изменить уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы. В связи с этим представляет интерес определение влияния условий культивирования на содержание I α -формы целлюлозы в бактериальной целлюлозе.

В качестве продуцента бактериальной целлюлозы использовали бактерии *Gluconacetobacter sucrofermentans* ВКПМ – 11267. Для культивирования штамма продуцента использовали HS (Hestrin–Schramm) среду [4]. Бактериальную целлюлозу получали при культивировании продуцента в стационарных условиях при комнатной температуре в течение 7 суток. Гель-пленку бактериальной целлюлозы очищали последовательной обработкой 0,5%-ным раствором NaOH и 0,2 н соляной кислоты при температуре 80 °С в течении 60 минут. После каждого этапа обработки гель-пленку длительно отмывали от щелочи и кислоты.

Определение Iα-фазы бактериальной целлюлозы проводили с помощью инфракрасной спектроскопии. Расчет содержания Iα-фазы бактериальной целлюлозы проводили с помощью уравнений 1-3 [6].

$$X_{1\alpha} = A_{\alpha} / (A_{\alpha} + A_{\beta}) \quad (1)$$

$$A_{\alpha} = A_{750 \text{ см}^{-1}} - A_{800 \text{ см}^{-1}} \quad (2)$$

$$A_{\beta} = A_{710 \text{ см}^{-1}} - A_{800 \text{ см}^{-1}} \quad (3)$$

где: $A_{750 \text{ см}^{-1}}$ – поглощение в инфракрасном спектре при 750 см⁻¹;

$A_{710 \text{ см}^{-1}}$ – поглощение в инфракрасном спектре при 710 см⁻¹;

$A_{800 \text{ см}^{-1}}$ – поглощение в инфракрасном спектре при 800 см⁻¹.

На уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы оказывают влияние такие параметры как количество используемого источника углерода, дополнительно вносимые в питательную среду вещества, режим культивирования и уровень аэрации. В связи с этим была проведена оценка влияния этих параметров не только на уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы, но и на содержание Iα-фазы в бактериальной целлюлозе.

В качестве источника углерода использовали глюкозу. Содержание глюкозы в питательной среде составляло 5; 6,5; 10 и 20 г/л. Уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы при увеличении концентрации источника углерода возрастал линейно и составлял 0,73 0,82 1,07 и 1,42 г. сухой бактериальной целлюлозы на литр питательной среды соответственно. Однако перерасчет на 1 г используемой сахарозы приводил к обратной линейной зависимости. Степень превращения глюкозы в целлюлозу был максимален при более низкой концентрации глюкозы и составлял 14,6%. При стандартном содержании глюкозы (20 г глюкозы на 1 л. среды) степень превращения глюкозы в целлюлозу составила 7,1%, что в 2 раза меньше, чем при концентрации глюкозы в среде 5 г/л.

Результаты анализа содержания Iα-фазы в бактериальной целлюлозе, полученной при выращивании продуцента на питательных средах с разным содержанием глюкозы с помощью инфракрасной спектроскопии, представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Влияние содержания источника углерода на содержание α -фазы
в бактериальной целлюлозе**

Содержание глюкозы в среде, г/л	Содержание α – фазы в бактериальной целлюлозе, %
5	34 $\pm$ 3
6,5	38 $\pm$ 2
10	36 $\pm$ 3
20	35 $\pm$ 2

Из представленной таблицы следует, что содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе не изменялось при изменении количества сахарозы в питательной среде.

Известно, что этиловый спирт увеличивает уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы. Предполагается, что это связано со снижением уровня образования мутантов, не способных к синтезу бактериальной целлюлозы. Содержание этилового спирта в среде варьировали от 0,5 до 2%. При выращивании продуцента в условиях отсутствия этилового спирта уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы составляет 0,73 г/л по истечению 7 суток статического культивирования. Добавление этилового спирта к питательной среде в количестве 2% приводило к увеличению уровня биосинтеза бактериальной целлюлозы до 2,17 г/л. Использование этилового спирта в количестве 0,5 и 1% приводило к увеличению уровня биосинтеза целлюлозы до 1,71 и 2 г/л соответственно. Результаты анализа содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе, полученной при выращивании продуцента при различных концентрациях спирта с помощью инфракрасной спектроскопии, представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе в зависимости
от концентрации этилового спирта в питательной среде**

Концентрация этилового спирта, %	Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе, %
0	40 $\pm$ 3
0,5	39 $\pm$ 2
1	37 $\pm$ 2
1,5	37 $\pm$ 3
2	38 $\pm$ 2

Из данной таблицы следует, что содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе не меняется при добавлении этилового спирта в концентрации от 0,5 до 2%. В связи с этим можно сделать вывод, что несмотря на то, что этиловый спирт приводит к значительному

увеличению уровня биосинтеза бактериальной целлюлозы, тем не менее, он не влияет на содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе.

При использовании в качестве источника углерода глюкозы происходит образование глюконовой кислоты, которая является побочным продуктом, снижающим pH и, как результат, уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы. Известно, что образование глюконовой кислоты снижается, а производство бактериальной целлюлозы увеличивается при добавлении в среду лигносульфонатов. Это объясняется наличием антиоксидантов и полифенольных соединений в лигносульфонатах. Как следует из таблицы 3, добавление лигносульфоната в питательную среду не приводит к изменению содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе.

Таблица 3

**Изменение содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе
в зависимости от концентрации лигносульфоната в питательной среде**

Концентрации лигносульфоната, %	Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе, %
0,5	37 $\pm$ 2
1	35 $\pm$ 2
1,5	36 $\pm$ 2

В статических условиях культивирования уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы несколько выше чем в динамических условиях выращивания продуцента бактериальной целлюлозы. Результаты анализа содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе, полученной при культивировании в стационарных и динамических условиях с помощью инфракрасной спектроскопии, представлены в таблице 4.

Таблица 4

**Влияние статических и динамических условий культивирования
на содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе**

Условия культивирования	Содержание α – фазы в бактериальной целлюлозе, %
Статические условия	37 $\pm$ 2
Динамические условия	36 $\pm$ 2

Из данной таблицы следует, что содержание α -формы целлюлозы в бактериальной целлюлозе не меняется при использовании статических или динамических условий культивирования продуцента этого полисахарида.

На уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы большое влияние оказывает уровень аэрации. В связи с этим было рассмотрено влияние уровня аэрации при глубинном выращивании продуцента бактериальной целлюлозы на изменение содержания α -формы целлюлозы в синтезируемой бактериальной целлюлозе (см. табл. 5).

Таблица 5

Зависимость содержания α -фазы бактериальной целлюлозы от интенсивности аэрации при динамических условиях культивирования

Условия аэрации	Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе, %
0,9 м ³ /мин 300 об/мин	31±1
1,5 м ³ /мин 300 об/мин	33±2
2 м ³ / мин 300 об/ мин	29±1

Из приведенной таблицы можно сделать заключение, что изменение условий аэрации не приводит к какому либо значительному снижению содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что исследуемые условия культивирования продуцента бактериальной целлюлозы, влияющие на уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы, практически не влияют на содержание альфа-фазы в бактериальной целлюлозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешина Л. А., Глазкова С. В., Луговская Л. А. Современные представления о строении целлюлоз // Химия растительного сырья. – 2001. – № 1. – С. 5–36.
2. Лияськина Е. В., Ревин В. В., Грошев В. М., Лияськин Ю. К. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов: учеб. пособие. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. – 120 с.
3. Ревин В. В., Лияськина Е. В., Пестов Н. А. Получение бактериальной целлюлозы и нанокompозитных материалов. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2014. – 128 с.
4. Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* // Biochemical Journal. – 1954. – Vol. 58. – P. 345–352.
5. Yamamoto H., Horii F. Structural changes of native cellulose crystals induced by annealing in aqueous alkaline and acidic solutions at high temperatures // Macromolecules. – 1989. – Vol. 22. – P. 4130–4132.
6. Wada M., Kondo T., Okano T. Thermally induced crystal transformation from cellulose I α to I β // Polymer Journal. – 2003. – Vol. 35. – P. 155–159.

СЫТИНА М. А., ЕФИМОВА Т. Н., АРТЕМЬЕВА Т. А.

**КОНФЛИКТЫ В ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИИ НА ТЕРРИТОРИИ КЛАСТЕРА
«БЫСТРИНСКИЙ» ПРИРОДНОГО ПАРКА «ВУЛКАНЫ КАМЧАТКИ»**

Аннотация. В статье рассматриваются проблемы конфликтов в природопользовании на особо охраняемых территориях. Составлена матрица конфликтов природопользователей природного кластера «Быстринский» природного парка «Вулканы Камчатки», где дана оценка степени влияния их деятельности на природные объекты.

Ключевые слова: конфликты природопользования, природный парк, матрица, природопользователь.

SYTINA M. A., EFIMOVA T. N., ARTEMIEVA T. A.

**CONFLICTS IN NATURAL RESOURCES MANAGEMENT OF THE CLUSTER
"BYSTRINSKY" OF NATURAL PARK "VOLCANOES OF KAMCHATKA"**

Abstract. The article considers the conflicts in natural resources management of specially protected natural areas. The study presents a matrix of the conflicts of natural resources users of the cluster "Bystrinsky" of natural park "Volcanoes of Kamchatka". The matrix includes an assessment of the effect of anthropogenic activities on natural objects.

Keywords: natural resources management, natural park, matrix, natural resources user.

Природный парк «Вулканы Камчатки» – самая крупная особо охраняемая территория Камчатки, которая включает в себя 4 кластера, среди которых и кластер «Быстринский». Основная цель его создания и функционирования – защищать природное наследие и представлять его интересы, способствовать управлению территорией теми способами, которые гарантируют экологическую и эстетическую ценность и целостность природы для будущих поколений [2].

Региональная особенность природного кластера «Быстринский» заключается в том, что по нему проходит Срединный хребет, который является одним из самых больших горных массивов Камчатки. Ичинский вулкан считается высшей точкой хребта, высота которого составляет 3 607 метров. Также особую ценность представляют не только памятники истории, но и культуры, археологии (неолитические стоянки). «Быстринский» кластер богат большим количеством термальных источников. Также он содержит более 400 горных озер, традиционные таёжные поселения и местные стойбища народов Севера, стада северного оленя, имеются нерестовые реки со множеством видов лосося. В кластере можно встретить многие известные на Камчатке виды растений и животных, включая «хвойный остров» с реликтовыми ельниками [3, с. 6-10].

Деятельность человека в отношении природы часто носит конфликтный характер и приводит к различным последствиям. Часто окружающая нас среда не в силах сопротивляться. Она начинает угнетаться, забирая различные виды отраслей, причиняет ущерб и, в конечном счете, перестает развиваться [1].

Конфликты природопользования можно разделить на три вида: потенциальные, реальные и ложные.

Потенциальный конфликт природопользования открыто не проявляется, он вызывается реальным ограничением природопользования в природоохранном комплексе национального парка в том случае, когда имеются разные точки зрения среди участников конфликта на формы и объемы природопользования, а также на справедливость получения доходов от него. Изначально потенциальный конфликт природопользования характерен всем национальным и природным паркам.

Реальный (открытый) конфликт природопользования – это настоящее столкновение между участниками, которые состоят в конфликте на почве разногласий в формах и объемах природопользования и получения доходов от него, который происходит после инцидента конфликта природопользования.

Реальный конфликт подразделяется на четыре подвида природопользования:

- а) конструктивный, который возникает, исходя из реально существующих между участниками конфликта противоречий;
- б) случайный, возникающий по недоразумению или случайному стечению обстоятельств;
- в) смещенный, возникающий на ложном основании, когда истинная причина скрыта;
- г) неверно приписанный конфликт, когда настоящий виновник находится в стороне в то время, как в конфликте задействованы совершенно случайные люди.

Ложный конфликт природопользования – ситуация, когда реально существующей причины нет, но участники конфликта восприняли её за настоящую. Он обычно проявляется в том случае, когда стороны обладают малым объемом информации. Его причина может заключаться в низком экологическом просвещении сотрудников национального парка, а также их работы со средствами массовой информации, соответствующими некомпетентными органами.

Для оценки взаимовлияния деятельности различных природопользователей на природные объекты была составлена матрица конфликтов территории кластера «Быстринский» (см. табл. 1), в столбцах которой размещены природопользователи и виды их деятельности, в строках – объект воздействия. На пересечении природопользователями оценивается уровень воздействия видов их деятельности на объект по шкале от 0 до 3 баллов

соответственно: 0 баллов – не имеется воздействия, 1 балл – слабое воздействие, 2 балла – среднее воздействие, 3 балла – сильное воздействие.

Таблица 1

Матрица конфликтов природопользователей природного кластера «Быстринский»

Природопользователи и виды их деятельности Объекты	Рекреационная деятельность	Эксплуатация автомобильной дороги	Местные жители	Горнолыжная база	Выпас оленей	Функционирование несанкционированной свалки
Лесная растительность	3	1	3	1	2	3
Недревесные ресурсы леса	2	1	3	0	2	3
Луговая и тундровая растительность	3	1	3	1	3	3
Воздушный бассейн	1	3	2	0	1	3
Воды	1	1	2	0	1	3
Почвы	1	3	3	2	2	3
Недра	1	1	2	0	1	3
Земли с/х назначения	0	2	3	0	0	2
Облик ландшафта	2	2	2	3	3	3

Конфликты между различными видами и целями природопользования, а также с местным населением имеют различное проявление. Рекреационная деятельность сильно влияет на такие объекты, как лесная и луговая растительность. Это связано с тем, что по мере посещения туристических троп и маршрутов идет процесс вытаптывания наземного слоя растительности. Эксплуатация автомобильной дороги сказывается на воздушном бассейне. Местные жители пользуются дарами леса и эксплуатируют земельные ресурсы. Традиционно, оленеводы, со своими стадами кочующие с одного пастбища на другое, дают экосистемам восстановиться. Горнолыжная база на окраине поселка Эссо не оказывает негативного воздействия.

С 2015 года на территории кластера «Быстринский» был выявлен реальный конструктивный конфликт в природопользовании. В 6 км к северо-востоку от с. Эссо (вдоль трассы Эссо – Анавгай) обнаружен несанкционированный полигон ТБО, который непосредственно является одним из самых проблемных моментов.

Из анализа матрицы видно, что наибольшее влияние на конфликтные ситуации в природопользовании территории кластера «Быстринский» оказывает функционирование

несанкционированной свалки, т.к. свалка привлекает доступностью пищевых ресурсов хищных зверей, в первую очередь, медведей, которые, в свою очередь, начинают растаскивать мусор по всему лесу, захламляя территорию вокруг свалки. Кроме того, свалка находится на одном из туристических маршрутов природного парка, за счет чего становится вдвойне небезопасным местом для нахождения туристов из-за высокой вероятности встречи с хищным зверем.

Несмотря на то, что мы живем в XXI веке – веке современной цивилизации, развития науки и техники, проблема мусора и несанкционированных свалок даже для природных парков остается актуальной. Опасность, которую представляют несанкционированные свалки трудно переоценить. Это постоянный источник угрозы для здоровья людей, диких и домашних животных, а также огромная опасность для лесных насаждений.

ЛИТЕРАТУРА

1. О конфликтах в природопользовании и необходимости их отображения в системе карт территориального планирования // Мат-лы Межд. конф. «Интеркарто – 8: ГИС для устойчивого развития территорий». – Хельсинки-Санкт-Петербург, 2002. – С. 73–76.
2. Постановление Главы администрации Камчатской области от 05.07.96 № 186 «Положение о природном парке “Быстринский”».
3. Чернягина О. А. Растительный и животный мир Быстринского природного парка (центральная Камчатка). – Петропавловск-Камчатский: Изд-во КамГУ им. Витуса Беринга, 2016. – 242 с.

ЛАВРОВА Ю. А., НОВОКУПЦЕВ Н. В., НАДЕЖИНА О. С.
СТРУКТУРА БИОКОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ
НА ОСНОВЕ ДРЕВЕСНЫХ ОПИЛОК И СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА
С ЛЕВАНСОДЕРЖАЩИМ БИОСВЯЗУЮЩИМ

Аннотация. Получены экологически чистые биокomпозиционные материалы с использованием смеси сосновых опилок со свекловичным жомом и левансодержащего биосвязующего, исследована их структура. Улучшенная структура является предпосылкой высоких физико-механических характеристик полученных биопластиков.

Ключевые слова: биокomпозиционные материалы, структура, древесные опилки, свекловичный жом, экзополисахарид леван.

LAVROVA YU. A., NOVOKUPTSEV N. V., NADEZHINA O. S.
STRUCTURE OF BIOCOMPOSITE MATERIALS BASED ON SUGAR BEET PULP AND
WOOD SAWDUST WITH LEVAN-CONTAINING BINDER

Abstract. By mixing of pine sawdust, sugar beet pulp and levan-containing binder environmentally friendly biocomposite materials were obtained. The advanced composite structure provides high physical and mechanical properties of the bioplastics obtained.

Keywords: biocomposite materials, structure, wood sawdust, sugar beet pulp, exopolysaccharide levan.

Леван – это внеклеточный полисахарид, который представляет собой полимер фруктозы. В химическом отношении бактериальный леван – нейтральный разветвленный полисахарид, построенный из остатков D-фруктофуранозы, которые в основной цепи соединены связями β -2 $\rightarrow$ 6, а в местах разветвлений — α -2 $\rightarrow$ 1 [1; 2; 3].

Леван обладает сильными адгезивными свойствами, поэтому одним из перспективных направлений его применения является замена им токсичных термореактивных смол, используемых при производстве композиционных материалов [4].

Одной из проблем в настоящее время является переработка отходов из растительного сырья. Жом сахарной свеклы – это отход свеклосахарного производства, представляющий собой первичную клеточную стенку, состоящую преимущественно из целлюлозы, связующих гликанов и пектиновых веществ [5].

Исходя из этого, целью нашего исследования являлось получение биокomпозиционных материалов на основе сосновых опилок и свекловичного жома с биосвязующим на основе левана, а также определение структуры полученного материала.

Материалы и методы. На первом этапе работы было получено биосвязующее на основе экзополисахарида *A. vinelandii* штамм D-08 культуру выращивали в течение 72 часов при 28° С. Состав агаризованной среды был следующим: г/л: K₂HPO₄ – 0,8; KH₂PO₄ – 0,2; CaSO₄ · 7H₂O – 0,2; MgSO₄ · 7H₂O – 0,2; Na₂MnO₄ – 0,05; FeCl₃ – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 20,0; агар-агар – 20,0.

С целью получения инокулята выращивание *A. vinelandii* штамм D-08 проводили на жидкой сахаросодержащей среде следующего состава: г/л: K₂HPO₄ – 0,8; KH₂PO₄ – 0,2; CaSO₄ · 7H₂O – 0,2; MgSO₄ · 7H₂O – 0,2; Na₂MnO₄ – 0,05; FeCl₃ – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 20,0. Культивирование *A. vinelandii* осуществляли в термостатируемом шейкере 72 часа при 250 об/мин и температуре 28° С.

Полученным инокулятом засеивали питательные среды, в состав которых вошли отходы пищевых производств – меласса, послеспиртовая барда и молочная сыворотка (в соотношении 1:1:1) с добавлением лигноцеллюлозных наполнителей в соотношении 1:3, 1:6 к питательной среде. Культивирование проводили в течение 72 часов (3 суток) при 250 об/мин и температуре 28° С.

Известно, что для роста бактерий *A. vinelandii* необходимы такие компоненты, как углеводы, спирты, органические кислоты, минералы в виде фосфорных и кальциевых солей [4]. Используемые нами отходы пищевых производств содержат вещества, необходимые для роста микроорганизма, так и для образования и накопления полисахарида левана.

На втором этапе работы были получены биоконпозиционные материалы на основе сосновых опилок и свекловичного жома с биосвязующим на основе левана.

Полученную нами культуральную жидкость с лигноцеллюлозным наполнителем подвергали упариванию и высушиванию в сушильном шкафу при температуре 50° С. Высушенную массу загружали в пресс-форму и подвергали горячему прессованию при температуре 140° С и давлении 19,6 МПа (15 т) в течение 5 минут.

На третьем этапе мы изучали структуру полученных биоконпозиционных материалов.

Изучение структуры биоконпозиционных материалов проводили на многофункциональном растровом электронном микроскопе с интегрированной системой фокусированного ионного пучка Quanta 200 i 3D (FEI Company, США).

Результаты и их обсуждение. Нами было отмечено, что вид лигноцеллюлозного наполнителя в среде культивирования не оказывал отрицательного влияния на рост и развитие бактерии *A. vinelandii* штамм D-08.

На третьи сутки полученная нами культуральная жидкость обладала густой и вязкой консистенцией, что показано на рисунке 1. Наиболее это было выражено в среде с содержанием смеси свекловичного жома и сосновых опилок в соотношении 1:1.



1

2

3

4

Рис. 1. Культуральная жидкость бактерий *A. vinelandii* штамм D-08 при росте на питательной среде с лигноцеллюлозным наполнителем: 1 – без лигноцеллюлозного наполнителя; 2 – с древесными опилками; 3 – с древесными опилками и свекловичным жомом (отношение лигноцеллюлозного наполнителя к питательной среде 1/3); 4 – с древесными опилками и свекловичным жомом (отношение лигноцеллюлозного наполнителя к питательной среде 1/6).

Электронное микроскопирование полученных нами материалов позволило получить изображение структуры образцов в высоком разрешении. На рисунке 2 можно наблюдать структуру прессованного материала, представляющего собой сосновые опилки без биосвязующего.

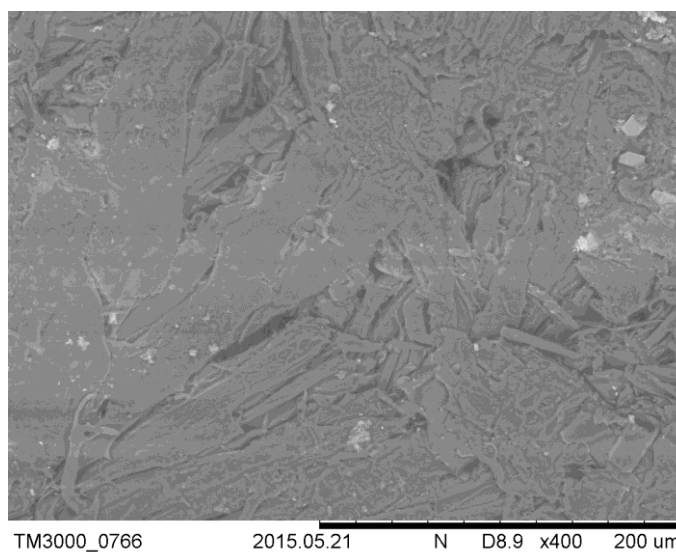


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия композиционного материала на основе сосновых опилок без биосвязующего.

Изображение демонстрирует наличие дезориентированных частиц на поверхности образца и наличие пустот (пор), следовательно, уменьшается площадь контакта частиц. Данный факт может негативно сказаться как на прочностных характеристиках материала, так и на избыточном водопоглощении.

Также нами был взят образец на основе сосновых опилок с левансодержащим биосвязующим, представленный на рисунке 3. Количество пор сравнительно снижалось. В результате, можно предполагать, что леван заполнил пространство между опилками и, следовательно, образовалась более плотная структура материала.

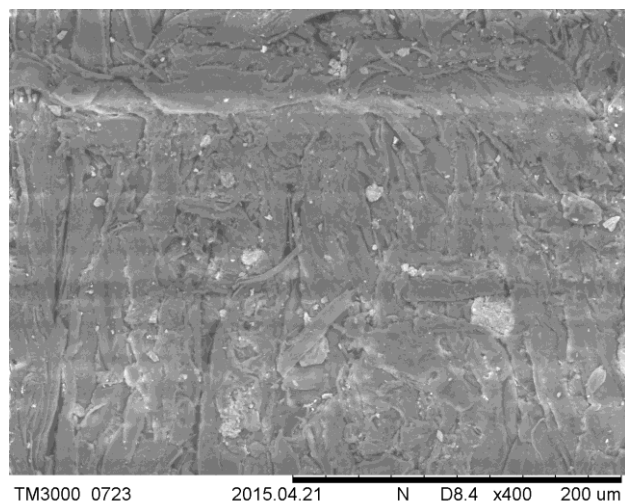


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия биокomпозиционного материала на основе сосновых опилок с левансодержащим связующим.

Третий образец представлял собой смесь свекловичного жома и сосновых опилок с левансодержащим биосвязующим, представленный на рисунке 4. Поверхность образца была представлена упорядоченными параллельными волокнами, которые плотно прилегают друг другу, что исключает наличие пор между ними.

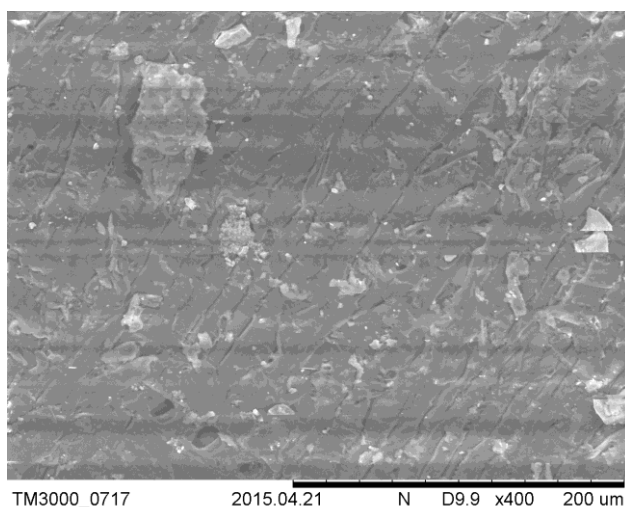


Рис. 4. Сканирующая электронная микроскопия биокomпозиционного материала на основе сосновых опилок и свекловичного жома с левансодержащим связующим.

Вероятно, что использование свекловичного жома и левансодержащего биосвязующего позволяет получить материал, в котором происходит эффективное обволакивание древесных опилок и появляются условия для создания большего числа клеевых слоев за счет адгезивных свойств левана и веществ, входящих в состав свекловичного жома. Стоит предположить, что это вызвано присутствием в свекловичном жоме пектиновых веществ и связующих гликанов (растительной целлюлозы). Такая плотная структура материала может служить предпосылкой для высоких физико-механических свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новокупцев Н. В. Оптимизация условий культивирования *Azotobacter vinelandii* Д-08 для увеличения выхода экзополисахарида / Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2016. – Т. 16, Вып. 2. – С. 164–168.
2. Ревин В. В., Шутова В. В., Новокупцев Н. В. Биокмпозиционные материалы на основе ультрадисперсных частиц древесины и левана, полученного путем микробного синтеза *Azotobacter vinelandii* Д-08 // Технические науки. – 2016. – № 1 – С. 53–57.
3. Srih Belghitha K., Dahecha I. et al. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2012. – Vol. 50. – P. 451–458.
4. Ревин В. В., Шутова В. В., Атыкян Н. А. и др. Теоретические и прикладные основы получения биокмпозиционных материалов с помощью биологических связующих. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. – 280 с.
5. Дранников А. В., Дятлов В. А., Шишова Е. И. Влияние структуры свекловичного жома на энергозатраты в процессе сушки // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 8. – С. 5.

ЗУЕВ В. Н., ТЫСЕВИЧ Е. А., ДАНИЛЮК А. В.

**ФЛОРИСТИЧЕСКИЕ И ФАУНИСТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ
ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ТУРИЗМА В БАРАНОВИЧСКОМ РАЙОНЕ**

Аннотация. В статье рассматривается возможность использования флоры и фауны локальных территорий для развития экологического туризма. Определено, что биоразнообразие является ключевым фактором развития этого вида туризма. Приводятся примеры видов растений и животных, которые привлекательны для наблюдения.

Ключевые слова: экологический туризм, флора, фауна, бёрдвотчинг, Барановичский район, Республика Беларусь.

ZUYEV V. N., TYSEVICH E. A., DANILIUK A. V.

**FLORISTIC AND FAUNISTIC BASES FOR THE DEVELOPMENT OF
ECOLOGICAL TOURISM IN THE BARANOVICHY DISTRICT**

Abstract. The article considers flora and fauna of local territories as a direction of ecological tourism development. In this connection, biodiversity is regarded as a key factor for the development of this type of tourism. Some examples of species of plants and animals which are attractive to observation are given.

Keywords: ecological tourism, flora, fauna, birdswatching, Baranovichy district, Belarus.

Основная цель предпринятого исследования – с учетом отечественного и зарубежного опыта рассмотреть возможности использования объектов флоры и фауны в целях развития экологического туризма, учитывая, что он рассматривается как самое эффективное средство массовой востребованности и доступности природных и культурных ценностей.

Природный и туристский потенциал Беларуси используется весьма ограниченно, хотя страна располагает богатыми туристскими ресурсами. Разработка комплекса мер по управлению экологическим туризмом, включающих создание организационного механизма взаимодействия, мониторинга и контроля, позволит максимально реализовать огромный потенциал развития экологического туризма в Беларуси. Между тем экологический туризм может включать в себя такой же риск, как и массовый туризм. Проекты экологического туризма, как правило, располагаются в сложных экосистемах, что несет риск разрушения именно тех ресурсов окружающей среды, на которых основано функционирование экологического туризма.

В нашей стране разработана и утверждена Национальная программа развития туризма в Республике Беларусь на 2011–2015 годы, в рамках которой значительная роль отводится экологическому туризму. Его основными направлениями являются: организация эколого-

образовательных и эколого-просветительских туров для разных групп населения, в том числе групп, специализированных по интересам (уникальные ландшафты, ценные водно-болотные или лесные угодья, знакомство с флорой и фауной, редкими и исчезающими видами растений и животных и т.д.); фотоохота на представителей животного и растительного мира, находящихся в естественных условиях [5].

Реализация основных направлений работы в сфере экотуризма невозможна без выявления и планомерного изучения объектов экотуризма. Объектом экотуристической деятельности может выступать природный или искусственные объекты (экосистемы, природные комплексы, памятник природы, места гнездования птиц и т.д.) и явления, имеющие экологическое и культурно-эстетическое значение.

Особое положение в ряду потенциальных экотуристических объектов занимают ключевые природные территорий. Они являются экологически значимыми территориями, в первую очередь с точки зрения сохранения биоразнообразия как отдельных регионов Земли, так и планеты в целом. К ключевым природным территориям необходимо отнести не только территории, занятые естественными природными комплексами (лесные массивы, болота, реки и т.д.), но и некоторыми типами искусственных экосистем (например, водохранилища, крупные каналы и т.д.). К этой же категории относятся территории, прилегающие к искусственным водным объектам с большой площадью и территории старинных парков [4].

Туристическим потенциалом какого-либо объекта или территории именуется совокупность приуроченных к данному объекту (территории) природных и искусственных объектов и явлений, а также условий, возможностей и средств, пригодных для формирования туристического продукта и осуществления соответствующих туров, экскурсий и программ [2]. Исходя из этого экотуризм является хорошим стимулом для изучения биоразнообразия территорий и охраны природных комплексов.

На экспертном уровне определен широкий потенциал территории Барановичского района для развития экологического туризма.

Барановичский район находится в северной части Брестской области Республики Беларусь и занимает площадь 2203 кв.км. Поверхность района представлена Барановичской водно-ледниковой равниной и Новогрудской конечно-ледниковой возвышенностью. На севере района расположены отроги Новогрудской возвышенности, средняя высота которых составляет 200-250 м. Новогрудская возвышенность имеет среднехолмистый моренный рельеф, который сформировался под воздействием днепровского оледенения. Поверхность равнины плоско-волнистая, со средней высотой 170-190 м. Поверхность равнины наклонена к югу в сторону Полесья и долины реки Щара.

Сельхозугодья занимают 52,2%, болота – 2,2%. Средняя плотность населения района – 23,7 чел/кв.км.

Барановичский район характеризуется преобладанием лесов в юго-западной и южной части и пашни в северной и восточной частях. Преобладают смешанные и хвойные леса. Поверхностных водных объектов мало. Реки района принадлежат к бассейну реки Неман.

На склонах Новогрудской возвышенности начинается и течет с севера на юг река Щара. Лесистость водосбора около 25%, причем верхняя часть водосбора бедна лесом. Русло реки на всем протяжении сильно извилистое. Основные притоки Щары на территории района – Мышанка (длина реки – 59 км), Молотовка (21), Лохозва (29), Смолянка (10), Исса.

Левый приток реки Неман – река Молчадь – начинается у дер. Голынка. Длина водотока – 100 км. Залесенность водосбора – 22%, распаханность – 40%. Основной приток Молчади – р.Своротва. Ее длина – 35 км. Русло в верхнем и среднем течении канализировано.

На севере района берет начало река Сервечь. Общая водосборная площадь реки составляет 770 кв.км, в т.ч. на территории Барановичского района – 140 кв.км. Рельеф водосбора в верхней части холмистый, пересеченный. Лесистость водосбора около 10%.

В северо-восточной части района протекает река Змейка – левый приток реки Уша.

Имеется несколько небольших озер. Наиболее крупным является озеро Колдычевское, расположенное в бассейне реки Щара. Площадь озера – 0,55 кв.км, длина 0,95 км, максимальная глубина 2,5 м, средняя глубина – 0,64 м. Котловина расположена среди Корытинского болота, которое в настоящее время используется под торфопереработки. Берега сплавинные. Озеро зарастает. Озеро Домашевичское (площадь 0,25 кв.км) находится к северо-западу от города Барановичи.

Водохранилище Гать (на реке Лохозва) создано в 1934 году для энергетических целей. Берега сильно изрезанные, под лесом. Дно выстлано торфом, илом. Площадь 1,26 кв.км. Максимальная глубина 4,7 м. Длина 3,1 км. Объем воды 3,15 куб.м. используется для отдыха (турбаза, летние детские лагеря отдыха, дом рыбака) и рыбной ловли.

На реке Сервечь создано вдхр. Кутовщина (пл.1 кв.км), на реке Мышанка – вдхр Барановичское, на других малых реках района – пруды (Стайки, Крошин, Вольно, Миловиды, Гута, Ежоны, Басины, Березовка, Павлиново, Полонка, Люшнево и др.).

В 1996 году на территории района был создан ихтиологический заказник «Стронга» (местного значения) – первая специальная особо охраняемая природная территория Беларуси по сохранению исчезающего вида рыбы – форели ручьевой. Площадь заказника – 6991 га. Большая лесистость территории, прилегающей к заказнику, и отсутствие мощных источников загрязнения обеспечивает чистоту воды рек, входящих в состав заказника, и тем

самым обеспечивает существование форели ручьевой – вида-индикатора состояния воды. На большей части заказника хорошо сохранились природные ландшафты.

В 1998 году на территории района был создан ландшафтный заказник «Стронга» (республиканского значения), который включил в себя территорию ихтиологического заказника и часть территории ботанического заказника. Площадь территории ландшафтного заказника – 12015 га. Вся территория заказника представляет интерес в разнообразных зооботанических аспектах. Здесь стыкуются границы геоботанических, луговых, болотных, почвенных районов, что определяет богатство флоры и фауны.

Территория Барановичского района интересна наличием большого количества мемориальных парков и их частей, зеленых насаждений в составе бывших имений. Пять мемориальных парков – в Ястрембели, Вольно, Крошино, Тугановичах, Верхнем Чернихове, объявлены памятниками природы [6].

На территории района выявлено около 40 родников, из них два – около дер.Тартаки и Ясенец объявлены геологическими (гидрологическими) памятниками природы [1].

В настоящее время практически любой регион Беларуси потенциально способен предлагать на туристский рынок разнообразный спектр отдельных услуг, их сочетаний, составляющих целостные туры, виды и способы отдыха.

Рассматривая возможности развития экологического туризма, флора и фауна территории может стать основой развития этого вида туризма без значительных подготовительных мероприятий и обустройства инфраструктуры.

Нами на основании анализа публикаций научного и информационно-туристского характера определены следующие виды растений и животных, которые будут интересны для ознакомления туристов.

На сегодняшний день на территории Барановичского района насчитывается около 30 усадебных парков и их фрагментов [4]. Каждый из этих парков в настоящее время имеет большое значение как места произрастания экзотических древесных растений. Значение изучения видов растений-экзотов объясняется возможным использованием старинных парков как своеобразных питомников этих видов.

Больше всего экзотов сохранилось в странных парках Верхнее Чернихово и Ястрембель (по 6 видов), 3 вида экзотов сохранилось в Тугановичском парке и по 2 вида — в парках Стайки и Нижнее Чернихово (см. табл.).

Экзоты старинных парков Барановичского района

Старинный парк	Количество видов экзотов	Экзоты
Большая Своротва	1	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.)
Вольно	1	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.)
Кутовщина	1	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.)
Павлиново	3	Ель голубая (<i>Picea pungens</i> Engelm. (f. <i>coerulea</i>)), туя западная (<i>Thuja occidentalis</i> L.), липа американская (<i>Tilia americana</i> L.)
Стайки	2	Туя западная (<i>Thuja occidentalis</i> L.), орех маньчжурский (<i>Juglans manshurica</i> Maxim)
Торчицы	1	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.)
Тугановичи	3	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.), клён сахаристый (<i>Acer saccharinum</i> L.), клён ясенелистный (<i>Acer negundo</i> L.)
Верхнее Чернихово	6	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.), липа американская (<i>Tilia americana</i> L.), ива козья (<i>Salix caprea</i> L.), ива восточно-балтийский (<i>S. orientobaltica</i> Cin.), ива алтайский (<i>C. altaica</i>) боярышник, яблоня ягодная (<i>Malus baccata</i>)
Нижнее Чернихово	2	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.), сосна Веймутова (<i>Pinus strobus</i> L.).
Ясенец	1	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.)
Ястрембель	6	Лиственница европейская (<i>Larix decidua</i> Mill.), сосна Веймутова (<i>Pinus strobus</i> L.), орех маньчжурский (<i>Juglans manshurica</i> Maxim), дуб красный (<i>Quercus rubra</i> L.), клён сахаристый (<i>Acer saccharinum</i> L.), клён ясенелистный (<i>Acer negundo</i> L.)

Из других представителей флоры привлекательными являются краснокнижные виды (хотя наблюдение их требует жесткого выполнения требований охраны природы!): лилия царские кудри, пыльцеголовник красный, пыльцеголовник длиннолистный, дремлик темно-красный, медвежий лук.

Из представителей фауны наиболее привлекательными являются птицы: черный аист, орлан-белохвост, скопа, обыкновенная пустельга, кобчик, филин, обыкновенный зимородок, зеленый дятел, трехпалый дятел, белошекая крачка, садовая овсянка, домовый и воробьиный сыч.

В сельских населенных пунктах района отмечаются обычные гнездящиеся, перелетные и транзитно-мигрирующие виды птиц (белый аист, ястреб-тетеревятник, обыкновенный канюк, обыкновенная кукушка, большой пестрый дятел, деревенская

ласточка, снегирь, поползень, белая трясогузка, горихвостка-чернушка, желтоголовый королек, обыкновенная овсянка). При грамотном построении туристской программы они тоже могут послужить основой экологического туризма.

Таким образом, флора и фауна Барановичского района предоставляет ряд возможностей для развития экологического туризма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зуев В. Н. Экологическое воспитание в учреждении образования: планирование и реализация: метод. рекомендации для преподавателей и кураторов высших учебных заведений. – Барановичи: РИО БарГУ, 2008. – 47 с.
2. Зуев В. Н. Экотуризм: организационно-экономические аспекты развития // Эко- и агротуризм: перспективы развития на локальных территориях: материалы Междунар. науч.-практ. конф., 3-4 апреля 2009 г., Барановичи, Респ. Беларусь. / редкол.: В. Н. Зуев (отв. ред.) [и др.]. – Барановичи - Минск: Орех, 2009. – С. 19-21.
3. Рындевич С. К. Ключевые природные территории Барановичского района как объекты экотуризма на локальных территориях // Эко- и агротуризм: перспективы развития на локальных территориях: материалы Междунар. науч.-практ. конф., 3-4 апреля 2009 г., Барановичи, Респ. Беларусь. / редкол. : В. Н. Зуев (отв. ред.) [и др.]. – Барановичи - Минск: Орех, 2009. – С. 16-18.
4. Рындевич С. К., Рындевич А. Г., Зуев В. Н. Старинные парки Барановичского района: резерваты биоразнообразия и объекты экотуризма: монография. – Барановичи: РИО БарГУ, 2008. – 239 с.
5. Стратегия устойчивого развития экологического туризма в Беларуси / под общ ред. Л. М. Гайдукевича, С. А. Хомич. – Минск: БГУ, 2008. – 351 с.
6. Экотуристические паспорта сельсоветов Барановичского района: информ.-справоч. пособие / В.Н. Зуев [и др.]. – Барановичи, 2015. – 96 с.

**ПРОСНИКОВА К. В., РЕВИНА Э. С., РЕВИН В. В., ГРОМОВА Н. В.,
СЕЙКИНА А. И., СТОЛБОВА Т. А., МАРТЫНОВА М. И.
ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА КРОВИ
ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ МИЕЛИНОВОГО НЕРВА**

Аннотация. Проведено исследование изменения показателей липидного состава крови при деструктивных процессах, происходящих в миелиновых нервах. Обнаружена зависимость количественных показателей липидного состава крови от длительности повреждения седалищного нерва у крыс. Можно утверждать, что повреждение миелинового нерва сопровождается изменениями липидного состава плазмы крови. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в содержании холестерина и фосфолипидов плазмы крови.

Ключевые слова: миелиновый нерв, липиды, демиелинизация, холестерин, триглицериды, фосфолипиды, липидный обмен.

**PROSNIKOVA K. V., REVINA E. S., REVIN V. V., GROMOVA N. V.,
SEIKINA A. I., STOLBOVA T. A., MARTYNOVA M. I.
CHANGES IN BLOOD LIPID METABOLISM OF DAMAGED MYELIN NERVE**

Abstract. A study of changes in blood lipid parameters during destructive processes in myelin nerves is carried out. The dependence of quantitative lipid composition of blood on the duration of damage to the sciatic nerve of rats is found. The study shows that damage to the myelin nerve is accompanied by changes in the lipid composition of the blood plasma. The most perceptible changes are observed in the content of cholesterol and phospholipids of the blood plasma.

Keywords: myelin nerve, lipids, demyelination, cholesterol, triglycerides, phospholipids, lipid metabolism.

Введение. Проведение возбуждения является одной из основных функций миелиновых нервов. Данный процесс обусловлен наличием трансмембранного потенциала и в большей степени определяется составом и свойствами компонентов биологических мембран, в том числе и липидов [1].

Демиелизация структуры нерва и снижение содержания миелина приводят к потере возбудимости нерва, а, следовательно, к нарушению скорости проведения сигнала [2].

Наибольший интерес представляет исследование изменений состояния нерва при повреждении, где внимание уделяется липидам миелинового нерва [3]. Эти нарушения приводят к тому, что в кровь выделяются вещества, составляющие основу молекулярной организации миелина: триглицериды (ТГ), холестерин (ХЛ), фосфолипиды (ФЛ) [1].

Липиды играют важную роль в долгосрочном функционировании нерва, а вариации липидного состава проявляются при некоторых патологиях [4]. Демиелинизирующие заболевания являются важной и сложной проблемой клинической неврологии, что обусловлено их значительной распространенностью, трудностями своевременной диагностики и лечения. Особого внимания заслуживает ряд миелинокластических заболеваний, вызванных травматическим повреждением нервов [5].

Повреждения периферической нервной системы составляют значительную часть неврологической заболеваемости взрослого населения. В современном мире ни у кого не может вызывать сомнения факт, что иммунная система играет важную роль в повреждениях периферической нервной системы. Изучение взаимосвязи иммунных процессов, влияния внеклеточного матрикса и процессов регенерации и дегенерации при данных повреждениях открывает новые возможности для разработки перспективных подходов в лечении больных с повреждениями периферических нервов, различных заболеваниях нервной системы, давая возможность по-новому оценить суть и механизм данных процессов [6].

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись беспородные белые крысы (возраст 2,5–3 месяца) массой 200–300 г, полученные из вивария Медицинского института «МГУ им. Н.П. Огарёва». Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Животных содержали на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде, по 4 животных в клетке.

Материалом исследования послужила плазма крови крысы. Забор крови для биохимического анализа осуществлялся на вторые сутки после перевязки седалищного нерва из сердца в количестве 3 мл. Кровь, взятая для исследования, стабилизировалась гепарином в соотношении 9:1 и содержала 0,10 мг гепарина в 1 мл. Плазму крови отделяли центрифугированием в течение 3 мин при 3000 об/мин. Полученную плазму отбирали в сухую, химически чистую пробирку.

Наложение лигатуры на седалищный нерв крысы осуществляли путем оперативного вмешательства под хлороформным наркозом. Операционное поле обрабатывали по задней поверхности правого бедра крысы. Основным инструментом при выполнении рассечения тканей является скальпель. Мышцу либо расслаивали вдоль волокон, либо рассекали. При расслаивании вначале рассекали скальпелем перимизий, а затем с помощью двух сложенных пинцетов раздвигали мышцы в стороны. В некоторых случаях приходилось пересекать мышечные волокна и в поперечном направлении.

Седалищный нерв повреждали, осуществляя перевязку нитью. По окончании операции рану послойно зашивали.

Для предотвращения инфицирования раны все инструменты перед оперативным вмешательством обрабатывались медицинским спиртом. После этого крыс рассаживали в клетки отдельно от остальной группы [7].

С помощью автоматического фотометрического анализатора Chem Well 2910 в плазме крови определяли показатели липидного обмена (холестерин, фосфолипиды).

Принцип действия анализатора основан на измерении значений оптической плотности жидкой пробы и последующем пересчете в необходимый параметр (концентрацию) лабораторного теста в соответствии с методикой лабораторного исследования. Результат измерения отображается на дисплее в виде значений оптической плотности и концентрации образца [8].

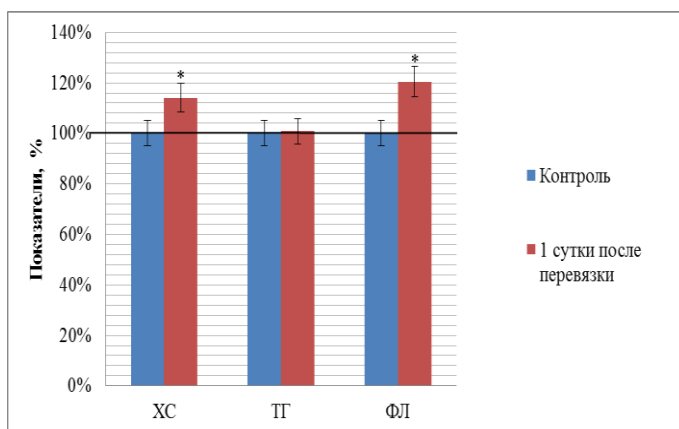
Количественное определение общего холестерина в плазме крови проводили с помощью ферментативно-колориметрического метода (CHOD-PAP).

Принцип метода: холестерин и его эфиры выделяются из липопротеинов под действием детергентов. Холестеринэстераза гидролизует эфиры холестерина, образующийся холестерин под действием холестериноксидазы окисляется. В процессе реакции образуется индикатор кинонимин из перекиси водорода и 4-аминофеназона в присутствии фенола и пероксидазы [9].

Концентрацию триглицеридов в крови проводили также ферментативно-колориметрическим методом, принцип которого заключается в следующем: триглицериды ферментативно гидролизуются на глицерин и свободные жирные кислоты под действием липопротеинлипазы. Концентрация глицерина определяется ферментативным методом, связанным с реакцией Триндера с образованием конечного продукта – кинонимина [10].

Метод определения количества фосфолипидов в плазме крови основан на гидролизе фосфолипидов фосфолипазой D и окислении высвобождающегося холина холиноксидазой (CHO) в бетаин с образованием перекиси водорода. В присутствие пероксидазы (POD) перекись водорода связывается с 4-аминофеназоном (4-AP) и дихлорфенолом с образованием комплекса кинонимина [11].

Результаты исследования и их обсуждение. При исследовании показателей липидного обмена крови крыс после перевязки седалищного нерва нами было выявлено, что уже через одни сутки после наложения лигатуры на седалищный нерв крысы наблюдаются достоверные изменения показателей общего ХЛ и ФЛ плазмы крови животного по отношению к контролю.



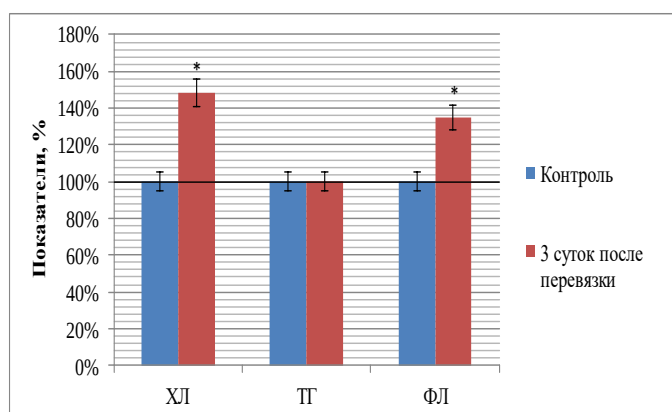
$*p \leq 0,05$

Рис. 1. Биохимические показатели ХЛ, ТГ и ФЛ крови крыс в норме и через 1 сутки после перевязки седалищного нерва.

наложения лигатуры на миелиновый нерв увеличивалась на 48,37% и на 35,19% соответственно по отношению к контролю. Содержание ТГ плазмы крови не изменялось (см. рис. 2).

При повреждении миелинового нерва на 7 день наблюдались достоверные изменения содержания холестерина и фосфолипидов плазмы крови животного. Концентрация ХЛ и ФЛ при моделировании патологии миелинового нерва увеличивалась на 28,26% и на 11,11% соответственно по отношению к контрольной группе животных. При этом содержание триглицеридов в крови не изменялось (см. рис. 3).

Таким образом, можно утверждать, что повреждение миелинового нерва сопровождается изменениями липидного состава плазмы крови. Наиболее выраженные



$*p \leq 0,05$

Рис. 2. Биохимические показатели ХЛ, ТГ и ФЛ крови крыс в норме и через 3 суток после перевязки седалищного нерва.

Так, относительное количество общего холестерина плазмы увеличивалось на 14,13%, а относительное количество фосфолипидов – на 20,37%. Содержание триглицеридов в крови практически не изменилось (см. рис. 1).

Максимально выраженные изменения содержания ХЛ и ФЛ в плазме крови отмечались на 3 сутки после перевязки миелинового нерва крыс. Так, концентрация ХЛ и ФЛ после

изменения происходят касаются количества ХЛ и ФЛ плазмы крови.

Концентрация ТГ после травмы нерва не изменяется, так как время полужизни ТГ в плазме крови относительно невелико – они быстро гидролизуются и захватываются различными органами, главным образом, жировой тканью. Возможно, поэтому, мы не наблюдали существенных изменений количества ТГ в плазме крови.

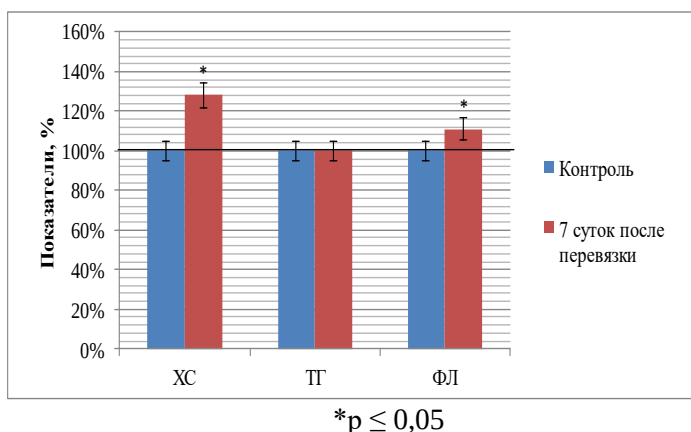


Рис. 3. Биохимические показатели ХЛ, ТГ и ФЛ крови крыс в норме и через 7 суток после перевязки седалищного нерва.

Заключение. При перевязке седалищного нерва крысы через 1, 3 и 7 суток наблюдается достоверное увеличение показателей общего ХЛ и ФЛ плазмы крови животного по отношению к контролю. Содержание ТГ в плазме крови остается практически неизменным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Храпай Е. В. Структурные нарушения при повреждении периферического нерва // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в медицине и физиологии: Першої міжнар. научн. конф. – СПб., 2010. – С. 190–196.
2. Родионова Н. Н., Браже Н. А., Браже А. Р., Харитоненков И. Г., Максимов Г. В. Влияние белков спирохеты *Borrelia burgdorferi sensu lato* на возбудимость миелинового нерва // Бюллетени експериментальної біології і медицини. – Москва, 2007. – Т. 143, № 1. – С. 36–39.
3. Деринская Е. В., Ревин В. В., Юданов М. А. Регенерация поврежденного седалищного нерва крысы при действии стимулятора роста // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 1. – С. 37.
4. Loers G., Aboul-Enein F., Bartsch U. et al. Comparison of myelin, axon, lipid, and immunopathology in the central nervous system of differentially myelin-compromised mutant mice: a morphological and biochemical study. – 2004. – Vol. 27, No. 2. – P. 175–189.
5. Родионова Н. Н. Исследование демиелинизации нервного волокна при инфекционных процессах // Десятая Всероссийская научная конференция студентов-физиков и молодых ученых. – 2004. – С. 856–857.
6. Геращенко С. Б., Коломійцев А. К., Чайковський Ю. Б. Нейрон-судинно-десмальні взаємовідношення в нормі та патології / Периферійний нерв. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. – 342 с.

7. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Э. А. и др. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Киев: Вища школа, 1983. – 432 с.
8. Руководство по применению анализатора фотометрического автоматического Chem Well / пер. с англ. – 2005. – 131 с.
9. Tiets N. N., Saunders W. B. Textbook of Clinical Chemistry, 1986. – 1917 p.
10. Buccolo G. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes // Clin. Chem. – 1993. – P. 476–482.
11. Takeya M. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids // Clin. Chem. – 1989. – P. 93–98.

**СЕЙКИНА А. И., ГРОМОВА Н. В., РЕВИНА Э. С., РЕВИН В. В.,
ПРОСНИКОВА К. В., МАРТЫНОВА М. И., СТОЛБОВА Т. А.
ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА КОНФОРМАЦИЮ И ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ
ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА**

Аннотация. Проведено исследование эритроцитов человека в норме и в условиях гипоксии. Установлено, что в условиях гипоксии наблюдается изменение конформации гемопорфирина гемоглобина.

Ключевые слова: эритроциты, гипоксия, гемоглобин, кислород, гемопорфирин, РАМАН спектроскопия, лиганды.

**SEIKINA A. I, GROMOVA N. V., REVINA E. S., REVIN V. V.,
PROSNIKOVA K. V., MARTYNOVA M. I., STOLBOVA T. A.
THE EFFECT OF HYPOXIA ON CONFORMATION AND REDISTRIBUTION
OF HEMOGLOBIN IN HUMAN ERYTHROCYTES**

Abstract. A study of human red blood cells in norm and in hypoxic condition was carried out. It is found that in hypoxic condition a change in the conformation of hemoglobin hematoporphyrin is observed.

Keywords: red blood cells, hypoxia, hemoglobin, oxygen, hematoporphyrin, Raman spectroscopy, ligands.

Введение. Эритроцит – высокоспециализированная клетка организма. Основная функция эритроцита – перенос кислорода из легких к тканям и диоксида углерода (CO₂) в обратном направлении. Основное содержимое эритроцита представлено главным образом дыхательным пигментом – гемоглобином [2].

В последние десятилетия большой интерес представляет изучение влияния гипоксии на эритроциты. Гипоксия – состояние кислородного голодания. Данное явление широко распространено и возникает при различных патологических состояниях, связанных с нарушением функций дыхательной, сердечнососудистой систем и транспортной функции крови [6].

В условиях гипоксии в эритроцитах возрастает скорость процессов дезинтеграции и увеличивается количество поврежденных эритроцитов. Гипоксическое состояние приводит к изменению конформации гемоглобина, нарушению биоэнергетических процессов в эритроцитах, снижению выработки АТФ. Также оно деструктивно действует на мембрану эритроцитов, снижая содержание дискоцитов и увеличивая количество эхиноцитов и дегенеративных форм [4; 5].

В крови на фоне гипоксии происходят сложные конформационные изменения в молекулах гемоглобина, приводящие к расстройству их структуры и основной функции – отдачи кислорода тканям [2].

Развитие гипоксии оказывает значительное влияние на метаболизм эритроцитов. Первоначально это проявляется развитием окислительного стресса активацией гликолиза и накоплением 2,3 дифосфоглицерата. В условиях гипоксии происходит освобождение железа из внутриклеточных белковых комплексов, что рассматривается как один из факторов активации окислительного стресса. Допустимо, что в условиях гипоксии меняется фосфорилирование тирозиновых остатков белков эритроцитов, что оказывает влияние на внутриклеточную сигнализацию, метаболизм, а также на мембранный транспорт, объем клеток и их форму [1]. В условиях гипоксии окислительный стресс в эритроцитах значительно влияет на активность глицероальдегид -3-фосфатдегидрогеназы и активность белка 3 полосы [7].

Существует предположение, что повышение дезоксигемоглобина может ограничивать постоянство эритроцитов к окислительному стрессу. Эритроциты человека способны регулировать образование супероксиданионов в зависимости от напряжения кислорода и конформации гемоглобина. Конформация гемоглобина определяет переход основных путей метаболизма глюкозы в эритроцитах, что вносит вклад в устойчивость эритроцитов к окислительному стрессу. Предполагается, что конформация гемоглобина контролирует метаболизм не только глюкозы, но и тиолов в эритроцитах. В условиях гипоксии эритроциты демонстрировали снижение восстановительного потенциала системы глутатиона [3].

Молекула гемоглобина может находиться в двух конформациях – напряженной и расслабленной. Расслабленная конформация связывает кислород в 70 раз быстрее, чем напряженная. Если переход от напряженной формы гемоглобина к расслабленной больше, то увеличивается сродство гемоглобина к кислороду, и наоборот. Одной из значительных причин нарушения кислородно-транспортной системы может быть изменение конформации гемопорфирина гемоглобина и его сродства к кислороду (O₂) [8].

Проведено исследование влияния условия гипоксии на конформацию гемоглобина крови доноров. Установлено, что при гипоксии наблюдались изменения гемоглобина эритроцитов по отношению к контролю.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования послужили эритроциты периферической крови человека, полученной из цельной крови доноров с ГБУЗ «Мордовская республиканская станция переливания крови» г. Саранска (возраст 25-45 лет, n=10). Все исследования проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki). В качестве антикоагулянта

использовали Na-цитрат, конечная концентрация которого составляла 13ммоль/л, рН = 7,4. Форменные элементы крови осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут. Плазму и лейкоцитарный слой отбрасывали, осадок ресуспендировали в десятикратном объеме среды промывания и инкубации эритроцитов, которая содержала 10мМ KH_2PO_4 , 3,5мМ KCl, 1,5мМ MgCl_2 , 145мМ NaCl, 6мМ глюкозу рН= 7,4. Осаждали эритроциты центрифугированием при 1000 g 15 минут, $T = 4^\circ \text{C}$. Процедуру промывания повторяли трехкратно. Полученный осадок эритроцитов разводили средой промывания в соотношении 1:5 (V:V). Суспензию использовали в течение часа. В течение этого времени эритроциты использовали для проведения дальнейших экспериментов.

Гипоксию вызывали путем воздействия на эритроцитарную массу газовой смеси азота в течение 10 мин.

Исследование конформации и свойств гемоглобина проводили с использованием рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния на приборе In Via Renishaw (Великобритания) [*Максимов и др., 2001] с короткофокусным высокосветосильным монохроматором (фокусное расстояние не более 250 мм). Для возбуждения рамановских спектров использовался лазер (длина волны излучения 532 нм, максимальная мощность излучения 100 мВт, объектив 100х). Регистратор данных – CCD детектор (1024x256 пикселей с пельтье-охлаждением до -70°C) с решеткой 1800 штр/мм. Оцифрованные спектры обработаны в программе WIRE 3.3. Произведена коррекция базовой линии, сглаживание спектров.

Результаты и обсуждение. Гипоксия сопровождается изменением кислородсвязывающей способности гемоглобина. Нами показано, что при гипоксии в эритроцитах уменьшается относительное показание оксигемоглобина на 13,86% по отношению к контролю (рисунок 1).

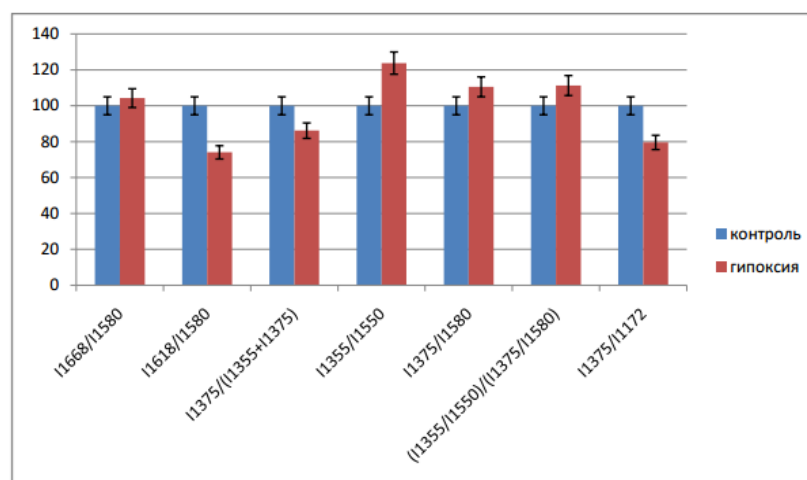


Рис. 1. Изменения кислородсвязывающей способности гемоглобина эритроцитов при гипоксии (* $p \leq 0,05$).

Относительное количество оксигемоглобина в эритроцитах человека уменьшилось на 13,83%. Известно, что при гипоксическом состоянии изменения конформации гемопорфирина гемоглобина способствуют меньшему погружению атома железа в пиррольное кольцо, что обеспечивает менее стабильное удержание кислорода, и, как следствие, повышение способности связывать и выделять лиганды. Относительная способность гемоглобина связывать лиганды увеличилась на 23,77%. Относительная способность гемоглобина выделять лиганды увеличилось на 10,57%.

Комплекс I Hb с оксидом азота (NO) при отсутствии связи между белком и гемопорфирином, регулирует способность Hb отдавать O₂. Его количество при гипоксии практически не изменилось. Содержание комплексов II Hb с NO при наличии связи между атомом Fe²⁺ и глобином уменьшилось на 25,92% по сравнению с контролем. Выраженность симметричных и асимметричных колебаний пиррольных колец (связано с конформационными изменениями пирролов) уменьшилось на 20,40% по сравнению с контролем.

Сродство гемоглобина к лигандам, в первую очередь, к кислороду, увеличилось на 11,28%. Повышение сродства обеспечивает большее взаимодействие между гемоглобином и кислородом, снижая эффективность отдачи кислорода, т.е. способствует снижению кислородтранспортной функции крови. Скорее всего при гипоксии гемоглобин отдает O₂ не попадая в периферические кровеносные сосуды, тем самым усугубляя ветвление гипоксии.

Заключение. Полученные данные, отражающие изменения структуры гемопорфирина гемоглобина при гипоксии, подтверждаются литературными источниками. Воздействие недостатка кислорода оказывает негативное влияние на нативные свойства гемоглобина и его способность переносить кислород за счет изменения сродства к лигандам. Повышение сродства обеспечивает большее взаимодействие между гемоглобином и кислородом, снижая эффективность отдачи кислорода, т.е. способствует снижению кислородтранспортной функции крови [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Е. М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51. Вып. 2. – С. 118–126.
2. Бизенкова М. Н. Общие закономерности метаболических расстройств при гипоксии различного генеза и патогенетическое обоснование принципов их медикаментозной коррекции // Медицина. – 2008. – № 3. – С. 25–30.

3. Глуткина Н. В., Пырочкин В. М. Кислородтранспортная функции и прооксидантно-антиоксидантное состояние крови у пациентов с перенесенным инфарктом миокарда // Кардиология. – 2012. – № 4. – С. 95–106.
4. Симутис И. С., Бояринов Г. А., Мухин А. С. Способы предтрансфузионной реабилитации консервированных эритроцитов // Медицинский альманах. – 2013. – № 3 (27). – С. 83–85.
5. Diesen D. L., Hess D. T., Stamler J. S. Hypoxic vasodilation by red blood cells evidence for an s-nitrosothiol-based signal // Circulation Research. – 2008. – Vol. 5. – P. 545–553.
6. Holly D., Glenn B. Cerebral microvascular dilation during hypotension and decreased oxygen tension: a role for nNOS // Am. J. physiol. Heart circ. physiol. – 2007. – Vol. 293. – P. 2193–2201.
7. Hardeman M. R. Goedhart P. T., Shin S. K. Methods in hemorheology // Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. – 2007. – P. 242–266.
8. Kinoshita A., Tsukada K., Soga T. Roles of hemoglobin allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes // Journal of biological chemistry. – Vol. 43, No. 6. – P. 107–112.
9. Pishchany G., Skaar E. P. Taste for Blood: Hemoglobin as a Nutrient Source for Pathogens // PLOS Pathogens. – 2012. – No. 8. – P. 11–14.
10. Smith S. A., Williams M. A., Leal A. K. et. al. Exercise pressor reflex function is altered in spontaneously hypertensive rats // J. physiol. – 2006. – Vol. 577, No. 3. – P. 1009–1020.
11. Maksimov G, V., Maksimova N. A. et. al. Study of conformational changes in hemoglobin protoporphyrin in essential hypertension // Biochemistry-Moscow. – 2001. – Vol. 66. – P. 295–259.

СПИРИНА Ю. П., МЕЛЬНИКОВА Н. А., РЕВИН В. В., ГРОМОВА Н. В.,

ПИНЯЕВ С. И., МОРОЗОВА А. А., ДУЛЕНОВА Е. А.

**ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА И ЛИПИД-БЕЛКОВОГО СООТНОШЕНИЯ В
ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ НЕРВЕ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПОСЛЕ ТРАВМЫ**

Аннотация. Проводилось исследование миелин-специфических белков и их изменений при повреждении периферического нервного волокна. Также определяли количество белка в миелиновой оболочке нерва. Установлено, что после повреждения содержание белка в нерве изменяется.

Ключевые слова: периферический нерв, миелин-специфические белки, регенерация нерва.

SPIRINA YU. P., MEL'NIKOVA N. A., REVIN V. V., GROMOVA N. V.,

PINYAEV S. I., MOROZOVA A. A., DULENOVA E. A.

A STUDY OF PROTEIN AND LIPID-PROTEIN RATIO

IN PERIPHERAL NERVE OF RATS IN NORM AND AFTER INJURY

Abstract. A study of myelin-specific proteins and their modifications during injury of peripheral nerve fibres was carried out. The amount of protein in the myelin sheath of the nerve was found. It is shown that the amount of protein varies after nerve injury.

Keywords: peripheral nerve, myelin-specific proteins, nerve regeneration.

Введение. Миелиновая оболочка является многослойной мембраной, которая имеет уникальные биохимические свойства. Миелин имеет обильный ряд белков, структура и функции которых до сих пор плохо изучены. Белки миелиновой оболочки участвуют в ряде неврологических заболеваний, в том числе аутоиммунных заболеваниях и наследственных невропатиях.

Детальное понимание структуры миелина и функций белка на молекулярном уровне необходимы для того, чтобы полностью понять их физиологические роли в миелиновой оболочке.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования послужили белые беспородные крысы массой 150-250 г. Материалом исследования послужили седалищные нервы крыс. Животных содержали в условиях вивария в индивидуальных клетках в условиях 12 часового дня и ночи со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты на животных выполнены под хлороформным наркозом в стерильных условиях экспериментальной операционной. Все манипуляции с животными осуществлялись в

соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.1984 г. № 724).

Для исследования животные были распределены на четыре группы. К первой группе относились животные без повреждения седалищного нерва (контрольная группа без введения антибиотика); ко второй группе – животные с раздавливанием нерва, выведенные из эксперимента на 7 день; третья группа – животные с раздавливанием нерва, выведенные из эксперимента на 14 день; четвертая группа – животные с раздавливанием нерва, выведенные из эксперимента на 21 день.

Для создания модели повреждения животным сдавливали седалищный нерв в верхней трети бедра под хлороформным наркозом. Сдавливание осуществлялось кровоостанавливающим незазубренным зажимом, в положении первого зубца в течение 30 сек [1], с последующим наложением швов на мышечные/кожные ткани и подкожным введением 100 мкл раствора гентамицина концентрации 40 мг/мл.

Отпрепарированные нервы помещались в раствор Рингера (6,5 г NaCl, 0,42 г KCl и 0,25 г CaCl₂, растворенные в 1 литре бидистиллированной воды) для теплостойких с температурой 37° С и выдерживались там 15 мин, после чего проводились исследования.

Для достижения поставленных целей были применены биохимические методы (определение содержания белка в миелиновой фракции методом Петерсона, определение общего содержания белка биуретовым методом, выделение белков миелиновой фракции), а также современные спектральные методы анализа (КР-спектроскопия).

Выделение белков миелиновой фракции (W.Norton and S. Poduslo, 1973). Нервные волокна были гомогенизированы в ступке тефлоновым пестиком в 0,8 М сахарозе (pH 7,0) в соотношении 1:2 соответственно. Далее гомогенат переносили в пробирку (500 мкл) и наслаивали сверху раствор 0,32 М сахарозы (250 мкл). Центрифугирование проводилось при 18 000 g, 4° С в течение 1 часа.

Полученный белый межфазный слой (≈400мкл.) осторожно удаляли из каждой центрифужной пробирки, ресуспендировали в 0,8 М сахарозы (4 мл), а затем гомогенизировали.

К гомогенату (≈750 мкл) добавляли 0,32 М сахарозу (≈250 мкл.) (наслаиванием), центрифугировали при 18 000 g, 4° С в течение 60 мин. После центрифугирования, межфазный слой суспендировали в 0,24 М сахарозе, и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин с целью устранения загрязнения микросом.

Затем плотно упакованный осадок гомогенизировали в дистиллированной воде и снова центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин.

Полученная белковая фракция состояла из сырого миелина и была использована для проведения дальнейших анализов.

Определение общего содержания белка биуретовым методом (А. Gornall, 1949). Метод основан на способности белков давать с раствором сернокислой меди фиолетовое окрашивание в щелочной среде. Для биуретовой реакции необходимо наличие двух ОН-групп и трех атомов азота, находящихся в полипептидной цепи. Группа, образующая пептидную связь ($-\text{OC}-\text{NH}-$) в щелочной среде, присутствует в своей таутомерной форме. В избытке щелочи происходит диссоциация водорода енольной ОН-группы, при этом возникает отрицательный заряд, с помощью которого кислород, взаимодействуя с медью, образует соль; кроме того, медь образует дополнительные (дативные) связи с атомами азота пептидных связей. Возникший комплекс характеризуется высокой стабильностью.

В пробирки, содержащие 1 мл раствора белка соответствующего разведения приливали 4 мл биуретового реактива, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 мин.

Измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре UVmini-1240 при 540 нм в 1 см кювете.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывали по калибровочному графику.

Определение содержания белка в миелиновой фракции по Петерсону (G.Peterson, 1983). Данный метод характеризуется высокой чувствительностью (10 – 100 мкг белка), позволяет эффективно определять белок в мембранных фракциях.

К 1 мл исследуемого раствора, содержащего белок, приливали 1 мл реагента А, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем в пробирку с реакционной смесью добавляли 0,5 мл реактива В, тщательно перемешивали и через 30 мин определяли оптическую плотность раствора на спектрофотометре UVmini-1240 при 670 нм в 1 см кювете.

Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывали по калибровочному графику.

Спектроскопия комбинационного рассеяния нерва (S. Morisaki, 2013). Комбинационное рассеяние света – это рассеяние света веществом, сопровождающееся заметным изменением частоты рассеиваемого света. В основе метода лежит взаимодействие монохроматического излучения (лазерного) с веществом, частицы которого испытывают периодические изменения [2]. Спектр КР исследуемого вещества – это зависимость интенсивности КР от частотного сдвига. Изменение положения максимума пика в спектре

КР или изменение относительной интенсивности пика связаны с изменением параметров связи/связей в молекуле и, следовательно, свидетельствуют об изменении конформации молекулы [3]. Одним из преимуществ КР спектроскопии является высокая чувствительность к незначительным изменениям в структуре исследуемых веществ, а также простота пробоподготовки и большой объем получаемой информации. Поэтому все, что требуется для сбора спектра – это направить падающий луч точно на образец, а затем собрать рассеянный свет.

Исследование конформации белков было выполнено на рамановском спектрометре *in Via Raman Microscope* фирмы Renishaw (Англия) с короткофокусным высокосветосильным монохроматором, фокусное расстояние которого не более 250мм. Для возбуждения рамановских спектров использовали лазер (длина волны излучения 532 нм, мощность излучения 5 мВт, объектив 5х). Регистратор данных – CCD детектор (1024x256 пикселей с пельтье-охлаждением до -700°C) с решеткой 1800 штр/мм.

Результаты и обсуждение. В первой серии эксперимента нами было определено общее содержание белка в нерве биуретовым методом. Повреждение нерва приводит к уменьшению содержания белка. Так, через неделю после повреждения содержание белка снижается на 59,1% (рисунок 1). В течение следующих двух недель посттравматического периода содержание белка постепенно увеличивается и через 3 недели после нанесения повреждения лишь на 11,9% отличалось от контрольных значений (см. рис. 1).

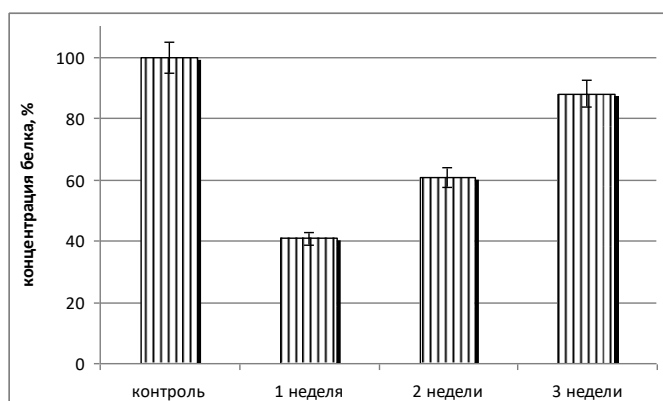


Рис. 1. Количественное изменение содержания общего белка поврежденного периферического нерва в норме и после повреждения ($p \leq 0,05$).

Полученные результаты объясняются тем, что после травмы седалищного нерва начинается дегенерация поврежденных тканей: происходят биохимические и биофизические изменения. Вес нерва и содержание в нем воды увеличиваются, понижается концентрация липоидов мякотной оболочки. Изменяется активность различных ферментов.

Постепенно в поврежденных нервах начинаются процессы регенерации, в основе которой лежит реакция нейронов на нарушенное равновесие в системе «нервная клетка – периферическое нервное окончание». Регенерация является сложным процессом восстановления этого равновесия, осуществляемого взаимодействием нервной клетки с центральным отрезком соответствующего нервного волокна, шванновским синцитием, соединительнотканскими элементами.

Аналогично общим белкам нерва изменяется количество белка миелиновой фракции (см. рис. 2). Через 1 неделю после повреждения седалищного нерва происходит достоверное снижение концентрации белка на 16,68% по сравнению с контролем; далее с течением времени концентрация белка в миелиновой фракции увеличивается, причем становится больше контрольных значений на 3,47% и 23,4% через 2 и 3 недели после повреждения нерва соответственно.

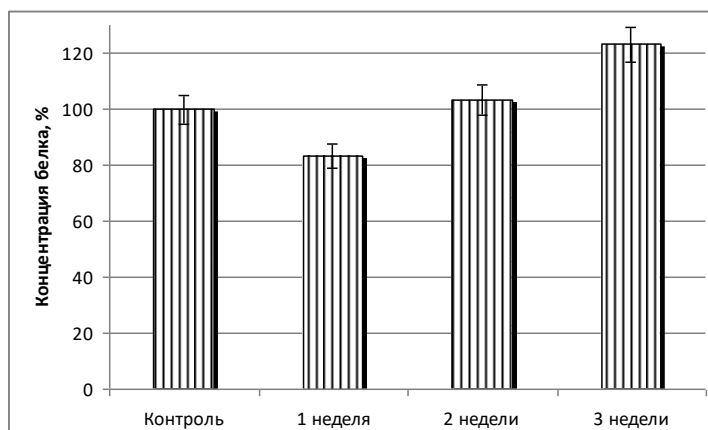


Рис. 2. Количественное изменение содержания белка в миелиновой фракции по Петерсону ($p \leq 0,05$).

При изучении процессов, происходящих в поврежденном периферическом нерве, нами были получены спектры комбинационного рассеяния в области $2800-3000 \text{ см}^{-1}$, в этой области для анализа нами были взяты полосы интенсивности 2940 и 2853 см^{-1} (рисунок 3).

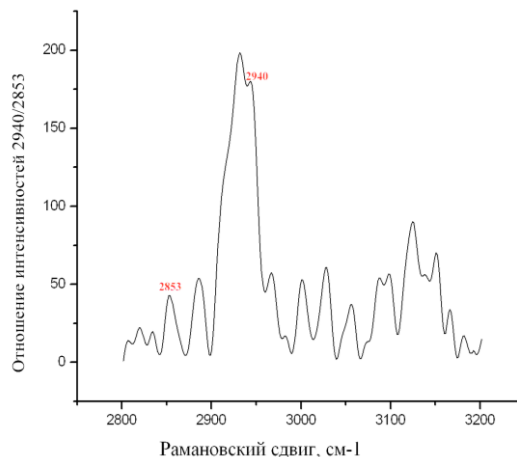


Рис. 3. Спектр комбинационного рассеяния неповрежденного седалищного нерва.

В спектре КР неповрежденной нервной ткани отображаются три важных пика в области $2800-3000\text{ см}^{-1}$. Анализ клеточных спектров предположил, что спектр седалищного нерва отражает компоненты аксона и миелина. Для миелина характерны полосы 2853 и 2885 см^{-1} полученные от липидов, а периферическая нервная ткань содержит большое количество липидов в составе миелиновых оболочек, которые окружают аксоны. Миелин швановских клеток включает в себя сфингомиелин и гликолипид галактоцереброзид [4]. Полоса 2940 см^{-1} соответствует $\text{C} - \text{H}_3$ симметричным валентным колебаниям, отражающим в основном содержание белка. Нервная ткань, структура, которая содержит много аксонов и белковых нейрофиламентов, последние в свою очередь, являются обильными фибриллярными компонентами цитоплазмы аксона. Нейрофиламенты состоят из полипептидных цепей с высоким содержанием остатков глутаминовой кислоты. Характерные полосы в спектре КР на 2940 см^{-1} и 2853 см^{-1} определяют соотношение белкового компонента (белки аксона) к липидному компоненту (липиды миелина) путем деления 2940 см^{-1} на 2853 см^{-1} .

В ходе анализа спектра КР в норме и при повреждении обнаружены следующие результаты: соотношение белок/липид через 1 неделю уменьшается на $9,1\%$; через 2 недели увеличивается на $18,6\%$; через 3 недели увеличивается на $92,1\%$; на 5 неделе увеличивается на $14,2\%$ по сравнению с контролем.

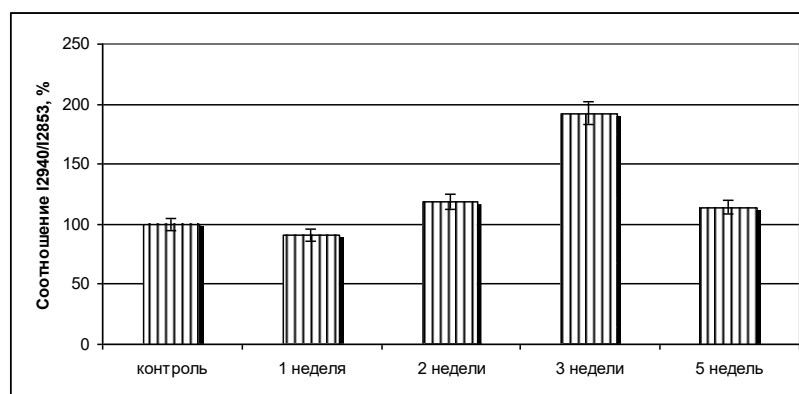


Рис. 4. Количественный анализ соотношения интенсивностей полос (I_{2940}/I_{2853}) для каждого момента времени ($p \leq 0,05$).

Полученные результаты мы можем объяснить тем, что после валлеровской дегенерации количество аксонов увеличивается и шванновские клетки начинают ремиелинизироваться вокруг аксонов, что приводит к увеличению содержания белка и липидов и накоплению их в периферической нервной ткани [5]. Следовательно, этим явлением можно объяснить изменение количественного соотношения интенсивности полос (I_{2940}/I_{2853}) в сторону увеличения.

Заключение.

1. Проанализировано содержание общего белка в норме и при повреждении и установлено, что с увеличением времени повреждения содержание его уменьшается. Через 1 неделю происходит уменьшение содержания общего белка на 59,1%; через 2 недели – на 39,2%; через 3 недели – 11,9% по сравнению с контролем.

2. Определено содержание белка в миелиновой фракции в норме и после повреждения и показано, что через 1 неделю после повреждения содержание белка уменьшается на 16,7%; через 2 недели содержание белка увеличивается на 3,5%; через 3 недели содержание белка увеличивается на 23,4% по сравнению с контролем.

3. Изучено соотношение белок/липид в норме и при повреждении. Получено, что соотношение максимально увеличивается через 3 недели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bridge P. M., Ball D. J., Mackinnon S. E. et al. Nerve crush injuries – a model for axonotmesis // Exp. Neurol. – 1994. – Vol. 127. – P. 284–290.
2. Morisaki S., Ota Ch., Matsuda K., Kaku N., Fujiwara H., Oda R., Ishibashi H., Kubo T., Kawata M. Application of Raman spectroscopy for visualizing biochemical changes during peripheral nerve injury in vitro and in vivo // Journal of Biomedical Optics. – 2013. – Vol. 18. – No. 11.
3. Копачевский В. Рамановская микроспектроскопия и КАРС-микроскопия для биологических применений // Наноиндустрия. – 2009. – № 4. – С. 72–75.
4. Kim T., Pfeiffer S. E. Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG // J. Neurocytol. – 1999. – No. 28. – P. 281–293.
5. Ceballos D., Cuadras J., Verdu E., Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve // J. Anat. – 1999. – No. 195. – P. 563–576.

ФОМКИНА М. М., ИБРАГИМОВА С. А.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ ОБРАБОТКИ СЕМЯН

Аннотация. Исследована возможность использования культуральных жидкостей *Xanthomonas campestris* B-2373 D и *Azotobacter vinelandii* Д-08 для обработки семян пшеницы сорта «Московская 39». Показано положительное влияние микробных экзополисахаридов (левана и ксантана) на водопоглотительную способность и энергию прорастания семян. Наибольший эффект достигается при использовании ксантана.

Ключевые слова: экзополисахариды, ксантан, леван, ризосферные бактерии, влагопоглотительная способность, энергия прорастания, семена пшеницы.

FOMKINA M. M., IBRAGIMOVA S. A.

USING OF MICROBIAL POLYSACCHARIDES FOR SEED TREATMENT

Abstract. The experimental study considers the possibility of using of *Xanthomonas campestris* B-2373 D and *Azotobacter vinelandii* D-08 culture fluids for the treatment of wheat seeds of "Moscow 39" variety. The positive effect of microbial exopolysaccharides on the water absorption and the energy of seed germination is shown. The maximum effect is achieved when using xanthan.

Keywords: exopolysaccharides, xanthan, levan, rhizospheric bacteria, water absorption capacity, energy of seed germination, wheat seeds.

Одна из актуальных проблем сельского хозяйства состоит в увеличении урожайности, сохранении плодородия почв, ростостимуляции, улучшении питания растений, увеличении влагоудерживающей способности семян. Регуляторы роста оказывают существенное влияние на все аспекты развития растений. Многофункциональность их воздействия привела к значительному расширению области их применения в растениеводстве, изучению действия полисахаридов как добавки к основным препаратам.

В современной биотехнологии растениеводства широко используются биопрепараты на основе ризосферных микроорганизмов, соответствующие требованиям экологической безопасности и обладающие широким спектром положительного действия на растения. Эффективные микробные препараты способны сохранять высокий титр и физиологическую активность клеток в течение длительного времени [6].

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекает введение в состав биопрепаратов наполнителей, стабилизаторов, биологически активных веществ, гелеобразующих компонентов, способствующих не только продлению сроков хранения, но и повышению адгезивных свойств биоагентов и их выживанию после инокуляции. Такие

добавки должны быть безвредными для природных экосистем и человека. Улучшение свойств биопрепаратов может достигаться как за счет увеличения продукции экзополисахаридов (ЭПС) самими продуцентами, так и за счет введения в них полисахаридов других микроорганизмов.

В практике растениеводства широко используются липкогенные экологически безопасные препараты, такие как экзополисахаридакриламид (ЭПАА), «Райкат Старт» и др. Они используются в технологиях выращивания сельскохозяйственных растений в качестве прилипателей. На основе бактериального экзополисахарида ксантана и ЭПАА разработана липкогенная композиция, введение которой в инокулянты обеспечивает выживаемость ризобий при хранении [11].

Показано, что биопрепараты, содержащие в своем составе полисахариды, увеличивают полевую всхожесть и стимулируют рост растений; выполняют роль быстро доступных запасов энергии; продлевают срок действия микробных препаратов и пестицидов. Растения, обработанные такими препаратами, быстро поглощают воду и питательные элементы, тем самым иницируя более раннюю фотосинтетическую активность и укорачивая цикл созревания урожая [10; 11]. При этом гелевые препараты имеют ряд преимуществ и, по данным многих авторов, часто оказываются более эффективными, чем жидкие [4; 9]. Так, покрытие семян воздухо- и водорегулирующей пленкой, способствует повышению устойчивости растений к стрессам и фитопатогенам в ранних фазах онтогенеза, а также защищает интродуцируемые и аборигенные почвенные микроорганизмы от повреждающего действия экстремальных факторов (температуры, высушивания, УФ-радиации) [8].

Цель работы: исследование влияния микробных полисахаридов на влагопоглощательную способность и развитие семян пшеницы.

Материалы и методы. Объектом исследований явились культуральные жидкости *Xanthomonas campestris* B-2373 D и *Azotobacter vinelandii* Д-08, содержащие ЭПС ксантан и леван соответственно. В качестве материала для исследования использовали семена озимой пшеницы сорта «Московская 39».

Для получения биопрепарата на основе бактерии *Azotobacter vinelandii* использовали меласную среду с добавлением минеральных солей. Культивирование проводили в термостатируемом шейкере при 150 об/мин и 28 °С в течение 48 часов. Полученный препарат, содержащий живые клетки (10^9 - 10^{10} КОЕ/мл) и микробные метаболиты, хранили при 4 °С в течение 40 сут.

Бактерию *Xanthomonas campestris* выращивали на меласной среде в термостатируемом шейкере при 150 об/мин и 28 °С в течение 4 сут. Затем культуральную

жидкость (КЖ), содержащую ксантан, подвергали термолизу (80 °С, 1 ч) для инактивации бактерий.

Полученные препараты использовали для обработки семян пшеницы при разведении водой 1:100.

Для определения влагопоглощительной способности выровненные семена пшеницы в количестве 50 штук обрабатывали в течение 1 часа следующими вариантами: контроль – водопроводная вода, опыт 1 – КЖ *Xanthomonas campestris*, опыт 2 – КЖ *Azotobacter vinelandii*.

После выдержки семена помещали в кювету с фильтровальной бумагой и подсушивали в течение 20 ч. По истечении данного времени семена взвешивали, помещали во влажную камеру и каждый час проводили расчет связанной воды.

В процессе хранения КЖ *Azotobacter vinelandii* количество синтезируемого полисахарида левана определяли гравиметрическим методом. Для этого 10 мл КЖ *Azotobacter vinelandii* центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин для осаждения клеток. Затем отбирали 5 мл супернатанта, приливали 5 мл 96% этилового спирта, выдерживали при комнатной температуре в течение суток, отделяли осадок и высушивали при 50 °С до постоянной массы в течение 24 ч. Высушенную массу взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г.

Для анализа влияния ЭПС на развитие семян определяли энергию прорастания – количество семян, проросших при заданных условиях за трое суток. Для этого опытные и контрольные семена пшеницы в количестве 100 штук помещали в чашки Петри на смоченную водой фильтровальную бумагу. Проращивание вели в климатической камере при 20 °С. Через 3 дня подсчитывали количество проросших семян и выражали в процентах от исходного числа.

Экспериментальные результаты обрабатывали статистическим методом дисперсионного анализа с использованием пакетов специальных программ Microsoft Excel 2010.

Результаты и их обсуждение. Для улучшения роста и минерального питания растений часто используют биопрепараты на основе ризосферных бактерий. На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии в этом направлении активно ведутся работы с высокопродуктивными штаммами *Pseudomonas aureofaciens* В-11364 и *Azotobacter vinelandii* Д-08. Показана возможность использования мелассы в качестве основного компонента среды для культивирования данных бактерий, что повышает адгезивные свойства и снижает себестоимость готовых биопрепаратов. Кроме того, за счет способности *Azotobacter vinelandii* синтезировать ЭПС леван отпадает необходимость дополнительного

использования прилипателей при обработке семян культуральной жидкостью бактерий [1; 7]. Также в качестве связующего можно использовать культуральную жидкость, содержащую ксантан, полученную при культивировании *Xanthomonas campestris* на мелассе [5].

В результате проведенных исследований было показано положительное действие микробных ЭПС левана и ксанта на энергию прорастания и влагопоглощательную способность (ВПС) биообработанных семян пшеницы.

Во всех вариантах максимальное влагопоглощение семян отмечено в течение первых 60 мин. В дальнейшем количество поглощаемой влаги снижалось, и через 4 часа было минимально. Наибольшие значения ВПС выявлены при обработке семян ксантаном. Так, за весь исследуемый период количество поглощенной воды составило 0,0139 г, что на 7,2 % и 29,5 % больше, чем в варианте с леваном и в контроле соответственно (см. рис. 1).

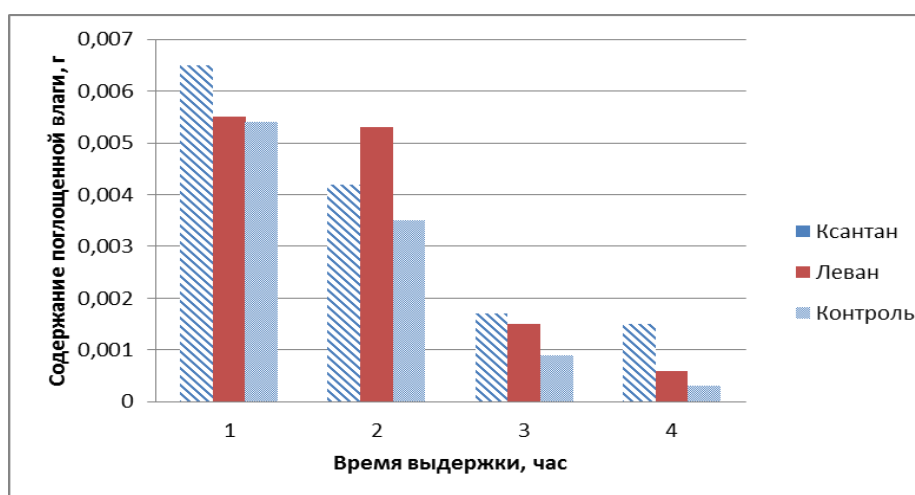


Рис. 1. Динамика ВПС семян пшеницы при обработке ЭПС.

Высокое водопоглощение ксанта обусловлено его способностью формировать гель. Уже при концентрации полисахарида 0,1% вязкость системы возрастает на порядок. При обработке семян раствором ксанта на поверхности создается полисахаридная оболочка, позволяющая поглощать большее количество воды по сравнению с леваном.

В связи с тем, что при проведении опыта использовалась КЖ, содержащая живые клетки *Azotobacter vinelandii*, то во время ее хранения количество левана, синтезируемого бактериями, изменялось. Так через 10, 20 и 30 суток хранения КЖ при 4 °С количество левана составило 3,4, 3,8, 4,0 г/л соответственно. При этом с увеличением количества левана ВПС семян также повышалась (в 1,7 и 2,2 раза через 20 и 30 сут относительно 10 сут хранения КЖ соответственно).

В дальнейшем содержание левана в КЖ снизилось, что может быть обусловлено его гидролизом. Из литературы известно, что микроорганизмы способны использовать

внеклеточные полисахариды в качестве энергетических субстратов и источника электронов в реакциях дегидрирования, являющихся обязательным этапом окислительно-восстановительных процессов в микробной клетке, а также в качестве источников углеродного питания, включая ЭПС или продукты их деструкции в конструктивный обмен [2].

Обработка семян биопрепаратами способствует высокой энергии прорастания семян и развитию растений, что обусловлено положительным влиянием бактериальных метаболитов [3]. Присутствие ЭПС также положительно воздействует на развитие растений.

Нами было показано, что при обработке семян в опытных вариантах с леваном и ксантаном значения энергии прорастания составили 88% и 95%, что на 7,4% и 20% больше, чем в контроле соответственно. При использовании КЖ *Azotobacter vinelandii*, хранившейся в течение 20 сут, показатель энергии прорастания достиг 100%, что свидетельствует о стимулирующем воздействии, как бактериальных метаболитов, так и полисахарида (см. рис. 2).

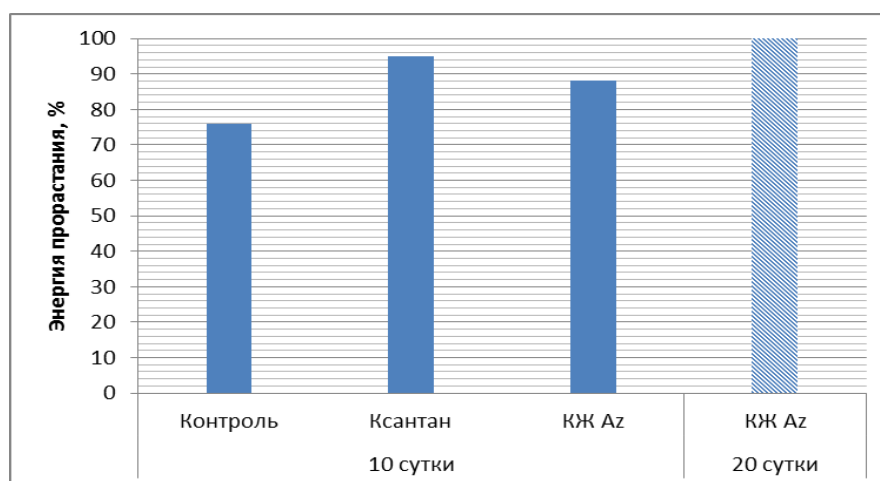


Рис. 2. Влияние ЭПС на прорастание семян пшеницы.

Таким образом, исследуемые микробные экзополисахариды оказывают благоприятное влияние как на семена пшеницы, так и на бактерии в культуральной жидкости, создавая оптимальные условия для их развития. Тем самым ксантан и леван могут выступать как биологически активные вещества для повышения качества микробных препаратов с пролонгированным сроком хранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурова Ю. А., Ибрагимова С. А., Ревин В. В. Получение бактериальной суспензии *Pseudomonas aureofaciens* 2006 на мелассе и изучение некоторых ее свойств //

- Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 10 (146). – С. 61–65.
2. Гоголева Е. В., Гречушкина Н. Н., Егоров Н. С. Экзополисахарид *Mycobacterium laticolum* штамм 121 // Тез. докл. V съезда Всесоюзн. микробиол. об-ва. – Ереван, 1975. – С. 118.
 3. Захаркина А. С., Ибрагимова С. А., Ревин В. В. Изучение развития семян кукурузы при обработке бактериальными суспензиями на основе ризосферных бактерий *Pseudomonas aureofaciens* и *Azotobacter vinelandii* // Ресурсосберегающие экологически безопасные технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции Лапшинские чтения: Материалы IX Международной научно-практической конференции. 18-19 апреля 2013 г. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2013. – С. 68–71.
 4. Косенко Л. В., Мандровская Н. М., Кругова Е. Д. и др. Действие ростстимулятора растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 250a и его азотустойчивый мутант М_71 в условиях различной обеспеченности азотом // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 1. – С. 40–47.
 5. Пат. 2421967 Российская Федерация, МПК⁵¹ C1 A01C 1/06, Способ получения оболочки для предпосевной обработки семян / В. В. Ревин, С. А. Ибрагимова, заявитель и патентообладатель ООО «Наука – Сервис», ГОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». – № 2010113399/21; заявл. 06.04.2010; опубл. 27.06. 2011, Бюл. № 18. – 4 с.
 6. Пацко Е. В., Воробей Н. А., Паршикова Т. В., Коць С. Я. [и др.]. Перспективность использования ассоциаций азотфиксирующих микроорганизмов для повышения урожайности растений // Бюл. Моск. общ. исп. прир. – 2009. – Т. 114. Вып. 2. – С. 84–86.
 7. Шутова В. В., Котина Е. А. Использование мелассы в средах для культивирования левансинтезирующего штамма *Azotobacter vinelandii* // Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке: Материалы всеросс. науч. конф. с междунар. участием. МГУ им. Н.П. Огарёва. 23-25 сентября 2015 г. – Саранск: Референт, 2015. – С. 54–57.
 8. Верхотурова І. С. Збереження життєздатності *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* в гелевих композиціях на основі липкогену ЕПАА // Молодь і поступ біології: Матеріали V міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів. 12 -15 травня 2009 р. – Львів, 2009. – С. 215.

9. Каменєва І. А., Грітчина Л. Ю., Мельничук Т. М. и др. Перспектива розробки гелічних препаратів на основі агрономічно корисних мікроорганізмів // Матеріали XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського. 25 - 30 травня 2009 р. – Ужгород: Ужгородський національний університет, 2009. – С. 376.
10. Мандровська Н. М., Кругова О. Д., Коць С. Я. и др. Дія синтетичного полісахариду на ріст бульбочкових бактерій і ризогенез коріння // Агроекол. журн. – 2005. – № 4. – С. 47–51.
11. Пат. 89120 України UA C12 №1/00, A 01C 1/00 Композиція для інокуляції насіння бобових рослин на основі бульбочкових бактерій та липкогена ЕПАА / Леонова Н. О., Воцелко С. К., Титова Л. В. и др.; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 24.

НОВОСЕЛОВА А. Д., КУРОЧКИНА М. А., МАЛЮТА О. В., ТАЛАНЦЕВ В. И.
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ
СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ВОД

Аннотация. Исследованы реакции шести тест-организмов на загрязнение природных вод. Наиболее чувствительными оказались люминесцентные бактерии и водоросль хлорелла.

Ключевые слова: биотестирование, тест-организмы, токсичность, природные воды.

NOVOSELOVA A. D., KUROCHKINA M. A., MALYUTA O. V., TALANTSEV V. I.
BIOTESTING FOR ASSESSING OF NATURAL WATER POLLUTION LEVEL

Abstract. The reactions of six test-organisms to natural water pollution were investigated. The tests showed that luminescent bacteria and alga chlorella were most sensitive to water pollutants.

Keywords: biotesting, test-organisms, toxic level, natural water.

Для успешного решения проблем рациональной эксплуатации биологических ресурсов водоемов всех типов и обеспечения человека чистой (биологически полноценной) водой необходим контроль качества природных вод. В условиях загрязнения биосферы наблюдается увеличение количества загрязнителей, поступающих в водную среду, среди которых тяжелые металлы, нефтепродукты, нитраты и другие химические соединения. Поэтому решение данных проблем необходимо начинать с оценки степени загрязнения водных объектов и оценки интенсивности биологического самоочищения водоемов. Использование технологий биотестирования в данном случае целесообразно.

Целью работы являлось исследование степени информативности различных тест-организмов для оценки степени загрязненности природных вод.

Для исследований была отобрана вода и донные отложения из пяти водоемов и водотоков Республики Марий Эл. В воде определялось содержание загрязнителей (нитриты, нитраты, аммонийный азот, хлориды, фосфаты, нефтепродукты), в донных отложениях – тяжелые металлы. Биотестирование проводили с использованием пяти аттестованных методик и одной авторской.

Биотестирование природных вод с использованием культуры водоросли хлорелла *Chlorellavulgaris* Beijerinck [1] свидетельствует о том, что большинство проб воды не превысили критерий токсичности. Наибольшим токсическим действием обладали пробы воды из р. Немда и р. Малая Кокшага в местах у плотины и ниже сброса очистных сооружений.

Биотестирование природных вод с использованием равноресничных инфузорий *Parameciumcaudatum* Ehrenberg [2] показало, что наиболее токсичными являются пробы воды

из оз. Сурок, на р. Малая Кокшага в районе пляже у Сернурского тракта, у ливневого канала по ул. Гоголя и у плотины в Сосновой роще.

Биотестирование природных вод с помощью люминесцентных бактерий осуществлялось на приборе «Биотокс-10». В качестве тест-объекта использовали биосенсоры серии «Эколюм», представляющие собой лиофилизированные культуры люминесцентных генно-инженерных бактерий *Escherichiacoli* M-17 [3].

Исследование возможной токсичности проб воды с использованием бактериальной биолюминесценции тест-системы «Эколюм» показало, что вода, взятая из р. Малая Кокшага в точках у плотины и ниже сброса очистных сооружений, является токсичной, как и вода из р. Немда в месте стока с очистных сооружений.

По мнению ряда исследователей [4] дафниевый тест имеет преимущества перед другими биотестами благодаря высокой чувствительности к ядам различной природы, отличается хорошей повторяемостью результатов в опытах.

Биотестирование на дафниях *Daphniamagna* Straus показало, что к четвертому классу опасности относятся пробы воды из р. Немда и р. Малая Кокшага (у плотины в Сосновой роще, ниже стока очистных сооружений на 50 метров). Остальные значения свидетельствуют об отсутствии токсичности. По результатам данного исследования можно сделать вывод о том, что дафнии реагируют только на явное загрязнение, соответствующее 4 классу опасности, и слабую токсичность на пределе 4 и 5 классов опасности зафиксировать они не смогут.

При проведении хронического эксперимента с дафниями обратил на себя внимание тот факт, что размеры рачков отличаются в вариантах опыта. Так, в воде, отобранной в районе сброса стоков с очистных сооружений (р. Немда), длина животного от головы до окончания хвостовой иглы почти в 1,5 раза превышала длину контрольных экземпляров, т.е. токсичная среда вызывала стимулирование роста тест-организма. Такая реакция дафний на загрязнение водоемов, возможно, является перспективным параметром для оценки состояния природных водоемов, но требует дополнительных исследований.

Существует достаточно большое количество авторских методик биотестирования не прошедших госрегистрацию, но успешно применяющихся для проведения научно-исследовательских работ. Одной из таких является методика с использованием семян редиса [5].

Биотестирование на редисе *Raphanussativus* L показало, что в вариантах опыта величина индекса токсичности исследуемого фактора (ИТФ_{ср}) варьируется в пределах от 0,91 до 1,03, т.е. находится в пределах нормы, а значит токсического воздействия на тест-организм ни в одном из вариантов опыта не обнаружено [6]. Таким образом,

чувствительность данного тест-организма к загрязнению природных вод очень низкая (см. табл 1).

Таблица 1

Реакции тест-организмов на загрязнение природных вод

№ п/п*	Показатели загрязнения водных объектов**		Показатели реакции тест-организмов				
	ТМ в донных отложениях	Поллютанты в воде	Дафнии	Водоросли	Бактерии	Инфузории	Редис
			БКР (48ч/96ч)	ТКР	Т	КР ₅₀	ИТФ _{ср}
1	0,23	0,54	1/1	1,25	1,9	0,054	
2	0,87	0,959	1/1	1,85	8,3	2,13	
3	0,444	0,035	1/1	1,0	1,8	0,78	
4	0,158	0,036	1/1	1,94	2,3	2,45	
5	2,58	1,378	1/1	1,69	1,77	0,95	0,97
6	0,723	1,652	1/1	2,08	8,41	2,13	0,96
7	9,474	1,085	1/1	2,88	6,03	1,44	1,01
8	2,83	1,065	1/1	2,81	7,72	0,63	1,03
9	0,598	0,815	1/1	1,28	1,81	0,346	0,96
10	8,54	0,818	8,71/19,1	4,26	28,32	2,13	0,93
11	8,00	8,2	1/1	3,66	48,47	0,288	0,96
12	8,05	3,353	1/1	3,02	5,37	0,26	0,99
13	8,26	3,2	5,49	7,58	15,11	1,096	
14	8,09	3,844	1,28/1,47	7,76	22,14	0,23	
15	8,06	3,82	6,03	8,51	18,25	2,21	

Для проведения корреляционного анализа с целью выявить наиболее чувствительный тест-организм к загрязнению природных вод были преобразованы параметры загрязнения водоемов поллютантами – рассчитана сумма отношений концентраций обнаруженных поллютантов к ПДК каждого из них по формуле:

$$\sum Ci / \text{ПДК}i,$$

где Ci – концентрация поллютанта;

$\text{ПДК}i$ – предельно-допустимая концентрация каждого поллютанта.

Поскольку содержание тяжелых металлов в донных отложениях российскими нормативными документами не регламентируется, то для оценки использовались ПДК для почв.

* Объекты исследования: 1 – оз. Табашинское, 2 – оз. Сурок, 3 – оз. Яльчик (дикий пляж), 4 – оз. Яльчик (базы отдыха), 5 – р. М.Кокшага (дубовая роща), 6 – р. М.Кокшага (пляж у Сернурского тракта), 7 – р. М.Кокшага (ул. Гоголя у ливневого канала), 8 – р. М.Кокшага (центральный пляж), 9 – р. М.Кокшага (понтонный мост в Ширийково), 10 – р. М.Кокшага (плотина в сосновой роще), 11 – р. М.Кокшага (ниже сброса очистных сооружений 50м), 12 – р. М.Кокшага (ниже сброса очистных сооружений 500 м), 13 – р. Немда (выше сброса 500 м), 14 – р. Немда (сток), 15 – р. Немда (ниже сброса 500 м).

** Сумма отношений концентраций обнаруженных поллютантов к ПДК каждого из них.

Результаты корреляционного анализа показали, что наиболее тесная связь наблюдается между содержанием тяжелых металлов в донных отложениях и изменением величины оптической плотности водорослей хлорелла (коэффициент детерминации $R^2=0,695$, в случаях с другими тест-организмами он не превышает 0,3), а также между суммарной величиной загрязнения основными химическими поллютантами воды и интенсивностью бактериальной биолюминесценции (коэффициент детерминации $R^2=0,640$, в остальных случаях он не превышал 0,2).

Исследования показали, что наиболее чувствительными к загрязнению основными поллютантами (нефтепродукты, фосфаты, нитраты, нитриты, аммонийный азот, хлориды) воды оказались люминесцентные бактерии, а на совокупное загрязнение тяжелыми металлами донных отложений наиболее остро отреагировала водоросль хлорелла.

Таким образом, применение технологий биотестирования с использованием водоросли хлореллы и люминесцентных бактерий для оценки качества природных водоемов является целесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.7-04). Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorellavulgaris* Beijer). – Красноярск: Изд-во Красноярского гос. ун-та, 2007. – 36 с.
2. ФР.1.39.2006.02506. ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06) Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Parameciumcaudatum* Ehrenberg. – М.: Изд-во МГУ, 2006. – 30 с.
3. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04). Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм» на приборе «Биотокс-10». – М.: Изд-во ООО НЦ «Экологическая перспектива», 2007. – 16 с.
4. ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.9-06). Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphniamagna* Straus. – Красноярск: Изд-во Красноярского гос. ун-та, 2006. – 46 с.

5. Малюта О. В., Григорьева А. Р. Экологический мониторинг: методические указания к выполнению лабораторных и практических работ для студентов. – Йошкар-Ола: Изд-во МарГТУ, 2011. – 64 с.
6. Курочкина М. А., Малюта О. В. Технологии биотестирования в оценке качества природных вод. Актуальные проблемы состояния и рационального использования водных ресурсов // Сб. статей региональной научно-практической конференции. – Йошкар-Ола, 2015. – С. 94–98.