

ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498
Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ХАБАРШЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

EXPERIMENTAL BIOLOGY

№4 (77)

Алматы
«Қазақ университеті»
2018



ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №4 (77)



25.11.1999 ж. Қазақстан Республикасының Мәдениет, ақпарат және қоғамдық келісім министрлігінде тіркелген

Қуәлік №956-Ж.

Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады

ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

Мукиянова Г.С., PhD, аға оқытушы (Қазақстан)

РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:

Бисенбаев А.Қ., б.ғ.д., ҚР ҰҒА академигі (ғылыми редактор) (Қазақстан)

Бекманов Б.О., б.ғ.к., доцент (ғылыми редактордың орынбасары) (Қазақстан)

Төлеуханов С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Айташева З.Г., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Кистаубаева А.С., б.ғ.к. (Қазақстан)

Иващенко А.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Мухитдинов Н.М., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Нуртазин С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Турусбеков Е.К., б.ғ.к., қауымдастырылған профессор (Қазақстан)

Омаров Р.Т., PhD (Қазақстан)

Искаков Б.К., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Сарбасов Д., PhD, профессор (АҚШ)

Орынбаева З., PhD, профессор (АҚШ)

Курмашева Р.Т., PhD (АҚШ)

Сапарбаев М., PhD, профессор (Франция)

Ищенко А., PhD (Франция)

Лось Д., б.ғ.д., профессор (Ресей)

ТЕХНИКАЛЫҚ ХАТШЫ

Қайрат Б.Қ., биология магистрі (Қазақстан)

Журнал материалдарында ауқымды биологиялық мәселелері қарастырылады – ғылыми шолу, теориялық және эксперименталдық зерттеулердің нәтижелері.

Мақалалар биологияның келесі бөлімдері бойынша жарияланады: ботаника, биотехнология, биохимия, өсімдіктер физиологиясы, генетика және молекулалық биология, клеткалық биология, биофизика, адам және жануарлар физиологиясы, зоология және ихтиология, цитология және гистология, микробиология және вирусология.



ҚАЗАҚ
УНИВЕРСИТЕТІ
БАСПА ҮЙІ

Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы

Гульмира Шаққозова

Телефон: +77017242911

E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

Редакторлары:

Гульмира Бекбердиева, Агила Хасанқызы

Компьютерде беттеген

Айгүл Алдашева

Жазылу мен таратуды үйлестіруші

Керімқұл Айдана

Телефон: +7(727)377-34-11

E-mail: Aidana.Kerimkul@kaznu.kz

ИБ № 12511

Пішімі 60x84 $\frac{1}{8}$. Көлемі 10,6 б.т. Офсетті қағаз. Сандық басылыс.

Тапсырыс № 9371. Таралымы 500 дана. Бағасы келісімді.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің

«Қазақ университеті» баспа үйі.

050040, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы, 71.

«Қазақ университеті» баспа үйінің баспаханасында басылды.

© Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, 2018

1-бөлім
БОТАНИКА

Section 1
BOTANY

Раздел 1
БОТАНИКА

**Дуйсенова Н.И.¹, Темирбаева К.Ж.²,
Белозеров И.Ф.³, Иманбаева А.А.⁴**

¹e-mail: nurzhaugan_84@mail.ru

²e-mail: botsad.garden@mail.ru

³e-mail: b.i.f.@bk.ru

⁴e-mail: imangarden@mail.ru

Мангышлакский экспериментальный ботанический сад,
Казахстан, г. Актау

РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОЙ ШКАЛЫ ДИАГНОСТИКИ ПЕРСПЕКТИВНОСТИ СОРТОВ *TULIPA L.* В МАНГЫШЛАКСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ

В статье изложены результаты интродукционного изучения сортов тюльпанов в коллекции Мангышлакского экспериментального ботанического сада (МЭБС), также представлены разработки комплексной шкалы диагностики перспективности сортов тюльпанов в аридных условиях Мангистау.

Целью наших исследований является выявление перспективных сортов тюльпанов и тиражирование наиболее декоративных из них для применения в ландшафтном дизайне и зеленом строительстве городов и населенных пунктах Мангистау.

В озеленении населенных пунктов и городов Мангистауской области тюльпаны почти не используются. Многие голландские сорта тюльпана, интродуцированные в иные климатические условия, не проявляют в полной мере своих декоративных качеств. Проведение исследований по оценке сортов дает возможность выявить наиболее перспективные сорта, максимально проявляющие в новых условиях интродукции свои биологические и декоративные свойства. Для определения перспективных качеств сортов *Tulipa hybrida hort.* были выбраны шкалы, наиболее распространенные в практике фитоинтродукции методики В.Н. Былова, Е.Л. Тыщенко и Ю.В. Тимкиной, и разработанная на основе их апробации новая региональная шкала оценки их перспективности с учетом принадлежности сорта к определенной группе.

В настоящее время в коллекции цветочно-декоративных растений МЭБС произрастают 152 сорта тюльпанов из 13 садовых классов. В данной работе представлены результаты двухлетних наблюдений за сортами тюльпанов. Интродуцированные тюльпаны в аридных условиях Мангышлака при благоприятных условиях успешно произрастают, показывают высокую декоративность и перспективность для внедрения в озеленение.

Структурно разработанная региональная шкала для сортов тюльпанов включает 11 диагностических признака, разбитых на три раздела: биологическая устойчивость; декоративно-габитуальные свойства; репродуктивная способность.

В результате проведенной комплексной оценки выявлено 4 «средних», 24 «повышенных», 17 «высокоперспективных» и 5 «очень высокоперспективных» сортов тюльпанов, которые позволяют создавать из них декоративные цветочные композиции различных типов в условиях аридной зоны Мангистау.

Ключевые слова: интродукция, сорта тюльпанов, комплексная шкала, перспективность, условия Мангистау.

Duisenova N.I.¹, Temirbaeva K.J.², Belozеров I.F.³, Imanbaeva A.A.⁴

¹e-mail: nurzhaugan_84@mail.ru

²e-mail: botsad.garden@mail.ru

³e-mail: b.i.f.@bk.ru

⁴e-mail: imangarden@mail.ru

Mangyshlak experimental botanical garden, Kazakhstan, Aktau

Development of complex scale of diagnostics of perspectivity of Tulipa L. varieties in a Mangyshlak experimental botanical garden

The article presents the results of the introduction study of tulip varieties in the collection of the Mangyshlak Experimental Botanical Garden (MEBG), also presents the development of a comprehensive scale for diagnosing the prospects of tulip varieties in arid conditions of Mangistau.

The goal of our research is to identify promising varieties of tulipa and replicate the most decorative of them for usage in landscape design and green building cities and towns Mangistau.

In gardening of settlements and cities of Mangystau Region tulips it is almost not used. Many Dutch tulip varieties, introduced into other climatic conditions, do not fully demonstrate their decorative qualities. Conducting studies on the assessment of varieties makes it possible to identify the most promising varieties that show their biological and decorative properties to the maximum in the new conditions of introduction. The most common scales in the practice of phytointroduction of the method of V.N. Bylov, E.L. Tyshchenko and Yu.V. Timkina and developed on the basis of their approbation of a new regional scale for assessing their prospects with regard to the belonging of a variety to a particular group were chosen to determine the promising qualities of varieties Tulipa hybrida hort.

At present, 152 varieties of tulips from 13 garden classes grow in the collection of flower and ornamental plants of MEBG. This paper presents the results of two-year observations of the varieties of tulips. All attracted varieties of tulips showed high adaptability. Introduced tulips successfully grow in arid conditions of Mangyshlak under favorable conditions, show a high decorative effect and the prospects for introduction into gardening.

Structurally developed regional scale for grades of tulips includes the 11th diagnostic sign, broken into three sections: biological stability; decorative habitus properties; reproductive ability. As a result of the comprehensive assessment, 4 «medium-term», 24 «high-promising», 17 «high-promising» and 5 «very high-promising» tulip varieties were revealed, which allow you to create decorative floral compositions of various types in the conditions of the Mangistau arid zone.

Key words: introduction, varieties tulip, complex scale, perspective, Mangistau conditions.

Дуйсенова Н.И.¹, Темирбаева К.Ж.², Белозеров И.Ф.³, Иманбаева А.А.⁴

¹e-mail: nurzhaugan_84@mail.ru

²e-mail: botsad.garden@mail.ru

³e-mail: b.i.f.@bk.ru

⁴e-mail: imangarden@mail.ru

Маңғыстау эксперименталдық ботаникалық бағы, Қазақстан, Ақтау қ.

Маңғыстау эксперименталдық ботаникалық бағында Tulipa L. сұрыптарының перспективтілік диагностикасының кешенді шкаласын жасау

Мақалада Маңғыстау эксперименталдық ботаникалық бағы (МЭББ) коллекциясының қызғалдақтар сұрыптарының интродукциясын зерттеу нәтижелері баяндалып, сонымен қатар аридті Маңғыстау жағдайындағы қызғалдақтар сұрыптарының перспективтілік диагностикасының кешенді шкаласы сипатталған.

Зерттеу жұмысының мақсаты қызғалдақтардың перспективті сұрыптарын анықтап, неғұрлым сәндік сұрыптарының ландшафттық дизайн және Маңғыстаудың қалалары мен елді мекендерінің жасыл құрылыстарында қолданылу ауқымын кеңейту.

Маңғыстау облысының қалалары мен елді мекендерді көгалдандыруда қызғалдақтар қолданылмайды. Көптеген қызғалдақтардың голландтық сұрыптарын өзге климаттық жағдайларға жерсіндірілсе өзінің сәндік сапаларын толық көрсетпейді. Осындай сұрыптарға баға беру жұмыстарын жүргізу арқылы жаңа жағдайларда жерсіндірілген өсімдіктерден биологиялық және сәндік жоғары қасиеттерге ие неғұрлым перспективті сұрыптарды анықтауға мүмкіндік береді. Tulipa hybrida hort. сұрыптарының перспективтілік сапасын анықтау үшін фитоинтродукция практикасында кең тараған В.Н. Былов, Е.Л. Тыщенко және Ю.В. Тимкина әдістерінің шкаласын қолдана отырып, сұрыптың перспективтіліктігін бағалайтын жаңа аймақтық шкала жасақталды.

Қазіргі таңда МЭББ гүлді-сәндік өсімдіктер коллекциясында қызғалдақтардың 13 класына жататын 152 сұрыпы бар. Бұл жұмыста қызғалдақтар сұрыптарына бақылаудың екі жылдық

нәтижелері келтірілген. Барлық отырғызылған қызғалдақтар сұрыптарының бейімділігі жоғары. Жерсіндірілген қызғалдақтар аридті Маңғыстауда қолайлы жағдайлар жасалынса жақсы өсіп, көгалдандыру жұмыстарында сәндік және перспективтіліктің жоғары дәрежесін көрсетеді.

Қызғалдақ сұрыптары үшін жасақталған аймақтық шкала 11 диагностикалық белгілерге біріккен 3 бөлімнен тұрады: биологиялық тұрақтылық; сәндік қасиеттері; репродуктивтік қабілеті. Сұрыптарға баға беру нәтижесінде аридтік Маңғыстау жағдайында қызғалдақтардан сәндік гүлдер композициялардың түрлі типтерін жасауға ұсынылатын 4 «орташа перспективтілік», 24 «көтеріңкі перспективтілік», 17 «жоғары перспективтілік» және 5 «өте жоғары перспективтілік» сұрыптары анықталды.

Түйін сөздер: интродукция, қызғалдақтар сұрыптары, кешенді шкала, перспективтілік, Маңғыстау жағдайы.

Введение

Одним из направлений научной работы Мангышлакского экспериментального ботанического сада (далее МЭБС) является разработка и обновление озеленительного ассортимента в Мангистау, отличающегося особенно суровыми почвенно-климатическими условиями: жарким засушливым летом, пыльными бурями, суховеями, постоянным дефицитом воды, почти беснежной зимой с частыми холодными ветрами. Все это формирует крайне неблагоприятные условия для интродукции растений и создания садово-парковых насаждений.

На современном этапе зеленого строительства требуется особое внимание обращать не только на устойчивость растений к воздействию лимит-факторов окружающей среды, но и на их декоративность. Для решения задач по декоративному садоводству осуществляется работа в области интродукции цветочно-декоративных растений, представляющих определенную ценность для озеленения, так как потребность в новом ассортименте возрастает [1]

За 46-летний период деятельности в МЭБС создан коллекционный генофонд цветочно-декоративных растений, насчитывающих более 510 видов, форм и сортов одно-, многолетних и луковичных растений из 89 родов и 36 семейств [2-5]. Среди них одними из устойчивых, декоративных и перспективных являются тюльпаны.

Род Тюльпан (*Tulipa L.*) представлен 160 видами, 32 из которых произрастают в Казахстане. Родоначальниками современных культурных сортов, включая всемирно известные голландские, являются дикорастущие тюльпаны, ареал естественного обитания некоторых располагается только на территории Казахстана [6-8]. В озеленении населенных пунктов и городов Мангистауской области тюльпаны почти не используется. Это наиболее эффективная луковичная культура для весенних цветников. Немногие декоратив-

ные растения могут соперничать с тюльпанами по разнообразию окрасок цветков. На сегодняшний день большая часть мирового сортимента тюльпана гибридного выведена голландскими селекционерами [9-12]. Многие из этих сортов, интродуцированные в иные климатические условия, не проявляют в полной мере своих декоративных качеств. Проведение исследований по оценке сортов дает возможность выявить наиболее перспективные сорта, максимально проявляющие в новых условиях интродукции свои биологические и декоративные свойства. Для этого целью наших исследований является изучение декоративных признаков новых сортов тюльпанов и отбор наиболее перспективных сортов для применения в ландшафтном дизайне и зеленом строительстве городов и населенных пунктах Мангистау.

Кроме того, привлеченные тюльпаны и дальнейшее привлечение новых сортов позволит создать моногибридную коллекцию из рода *Tulipa L.* Для ботанического сада важно как можно больше ознакомить население города с растительностью интродуцированной из различных географических мест обитания Земного шара. Эта коллекция очень живописная, состоит из многочисленных красочных оттенков и форм строения цветков, она будет одним из привлекательнейших уголков ботанического сада и вызывать интерес посетителей, экскурсантов.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследований послужили сорта тюльпанов (152 наименования) интродуцированные луковичами из Никитского ботанического сада (г. Ялта), ГБС РАН (г. Москва), Центрального ботанического сада Белоруси (г. Минск) и Ботанического сада МГУ им. Ломоносова (г. Москва). Для этого создан новый ландшафтно-коллекционный участок на общей площади 693,3 м², расположенной в 100-150 м от

административного здания МЭБС. Посадку проводили октября 2017 года, всего было высажено 656 штук луковицы тюльпана.

Выращивание посадочного материала и уход за растениями осуществлялся по региональным рекомендациям ботанического сада [13-15]. Луковицы высаживались в посадочные чеки размером 2 x 3 м, с шагом посадки от 0,1 до 0,2 м. В течение периода вегетации посадки регулярно поливали по два-три раза в неделю.

Морфологические особенности сорта тюльпанов изучались по стандартной методике, разработанной Р.А. Карпионовой [16, 17].

Для апробации существующих шкал определения перспективности интродукции растений были выбраны наиболее распространенные в практике фитоинтродукции методики В.Н. Былова [18], Е.Л. Тыщенко и Ю.В. Тимкиной [19] и региональная комплексная шкала МЭБС [20], а также коэффициент И.А. Смирнова [21].

Комплексная шкала диагностики перспективности сортов тюльпанов в аридных условиях Мангистау проводили по 100-балльной шкале с новыми критериями. Сумму баллов, набранных сортами при характеристике их по всем показателям, использовали для определения группы перспективности.

Результаты исследований и их обсуждение

Согласно методике, изучение сортов тюльпанов, их оценка и отбор перспективных сортов проводили по садовым классам. В настоящее время в коллекции цветочно-декоративных растений МЭБС произрастают 152 сорта тюльпанов из 13 садовых классов. В данной работе представлены результаты двухлетних наблюдений за сортами тюльпанов.

I группа. Раннецветущие тюльпаны

Класс 1 – Простые ранние тюльпаны. Культивируются с конца XVII века. В открытом грунте зацветают одними из первых. В классе 5,7% всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС содержит 5 сортов. По высоте сорта этого класса низкие и среднерослые растения от 25 до 30 см, имеют простые цветки бокаловидной формы. Окраска околоцветника от темно-красной ('Coulter Cardinal') и розовой ('Candy Prince', 'Flamingo', 'Secret Love') до белой ('Diana') оттенков. Начало цветения в условиях Мангистау отмечено на 8-10 апреля, а продолжительность цветения составляет средним 12 дней.

Класс 2 – Махровые ранние тюльпаны. Известны с конца XVII века. Произошли как споровые отклонения от Простых ранних. В классе 5,7% сортов всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 7 сортов тюльпанов данного класса. Высота растений от 20 до 31 см. Размер цветка 6-8 см в высоту и 8-10 см в диаметре, чашевидной формы, с прочным цветоносом. Окрас цветка разнообразный: розовый ('Foxtrot', 'Toronto Double'), красно-оранжевый ('Monte Orange', 'Willem Van Orange'), бордовый ('Palmyra', 'Royal Acres'), красные ('Wirosa'). Начало цветения на полуострове Мангышлак отмечено с 8-15 апреля и цветут на протяжении 10-15 дней.

II группа. Среднецветущие тюльпаны

Класс 3 – Триумф тюльпаны. Выведены в начале XX века путем скрещивания из класса Дарвиновых тюльпанов с сортами из класса Простых ранних. Самый многочисленный по составу класс, насчитывающий 24,3% сортов всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС 37 сортов данного класса: 'Andre Citroen', 'Alexander Pushkin', 'Cape Town', 'Denmark', 'Happy Generation', 'Toyota', 'Zurel', 'Judith Leyster', 'Surprise', 'Leo Visser', 'Armani', 'Page Polka', 'Beauty Trend', 'Yokohama', 'Laptop', 'Silver Dollar', 'Mistress', 'Red Mark', 'Strong Gold', 'Gavota', 'Ronaldo', 'Paul Scherer', 'Ben Van Zanten', 'Jan Reus', 'Attila', 'Don Quichotte', 'Christmas Exotic', 'Yellow Crown', 'Jan Van Nes', 'Mata Hari', 'Barselona', 'Laura Fugi', 'Abra', 'Affaire', 'Alibi', 'Yellow Present', 'Negrita'.

Высота растений от 25 до 40 см. Цветок не махровый, чашевидной или бокаловидной формы, нераскрывающийся на солнце, 8-10 см высотой, отличается большим разнообразием расцветок, 13 сортов с двухцветной окраской ('Andre Citroen', 'Alexander Pushkin', 'Cape Town', 'Denmark', 'Happy Generation', 'Toyota', 'Zurel', 'Judith Leyster', 'Surprise', 'Leo Visser', 'Armani', 'Page Polka', 'Beauty Trend'). Начало цветения наступает с 13 по 16 апреля в зависимости от сорта. Продолжительность цветения составляет 10-12 дней.

Класс 4 – Дарвиновы гибриды. Класс выделен в 1960 году. Получены от скрещивания сортов из класса Дарвиновых тюльпанов с клоновым сортом тюльпана Фостера 'Мадам Лефебр'. В классе 4,5% сортов всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 25 сортов. Тюльпаны этого класса в основном средне-, высо-

корослые, высота растений от 40 до 60 см, с прочным стеблем и крупным бокаловидным цветком. Цветки разнообразны по окраске – белые ('Hakuun', 'Agrass White'), красные ('Ad Rem', 'London', 'Red Matador', 'Apeldorn Elite', 'Dover', 'Gordon Cooper', 'Fostery King', 'Parade', 'World Peace', 'World's Favourite', 'Hollands Gloria'), жёлтые ('Ivory Floradale', 'Golden Apeldoorn', 'Garant', 'Golden Parade', 'Golden Oxford'), розовые ('Marit', 'Salmon Impression', 'Ollioules', 'Pink Impression'), **оранжевые** ('Banja Luka', 'My Lady'), фиолетовые ('Royal Acres'). Их массовое цветение в условиях Мангистау отмечено с 10 по 20 апреля. Продолжительность цветения от 8 до 12 дней.

3 группа. Позднецветущие тюльпаны

Класс 5 – Простые поздние тюльпаны. Существует огромное количество одноцветковых, а также несколько многоцветковых сортов. В классе 20,3% сортов всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 5 одноцветковых и 4 многоцветковых сортов тюльпанов этого класса. У одноцветковых сортов тюльпанов высота растений достигает до 50 см. Цветки бокаловидные, крупные высотой до 13 см. Окраска цветков: белая ('Maureen', 'Sorbet'), розовая ('Rosy Wings'), фиолетовая ('Recreado'), **темно-бордовая** ('Queen of Night'). **Многоцветковые тюльпаны** более низкие 30-35 см высотой. Второй год интродукции многоцветковых тюльпанов у сорта 'Weisse Berliner' и 'Dragon King' отмечено фаза цветения. Остальные 2 сорта ('Purple Bouquet', 'Night Club') **вегетируют**. Цветение данного класса отмечено 18-20 апреля, продолжительность цветения составляет до 13 дней.

Класс 6 – Лилиецветные тюльпаны. Культивируются с XVI века. В классе 3,0% всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС 11 сортов данного класса: 'Alladin', 'White Triumphator', 'Green Star', 'Elegant Lady', 'Faire vings', 'Claudia', 'Jazz', 'Purple Dream', 'Balerina', 'Merilin', 'Purple Dream'. Для Лилиецветных тюльпанов характерна чашевидная форма цветка (как у лилий) с отгибающимися наружу и заостренными на концах лепестками, высотой до 8 см. Цветонос тонкий, 40-70 см высотой. В условиях Мангистау цветут со второй половины апреля. Первый год интродукции у лилиецветных тюльпанов цвели 'Alladin', 'Balerina', 'Claudia', 'Jazz', 'Purple Dream'. Продолжительность цветения составляет 8-10 дней. Тюльпаны данного класса можно широко использовать для озеленения на групповых и одиночных посадках и на срезку.

Класс 7 – Бахромчатые тюльпаны. Бахромчатые сорта являются результатом скрещивания Простых тюльпанов с тюльпанами Дарвина. Первый бахромчатый сорт 'Sandju' был зарегистрирован в Голландии в 1930 году, а в отдельный класс выделены в 1981 году. В настоящее время в классе 2,9% от мирового ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС 12 сортов данного класса: 'Aria Card', 'Fringed Elegance', 'Burgundy Lace', 'Mon Amur', 'American Eagle', 'Crystal Star', 'Honeymoon', 'Fringed Solstice', 'Bulldog', 'New Santa', 'Huis Ten Bosch', 'Blue Hiron'. Бахромчатые тюльпаны – это необыкновенно красивые сорта, у которых изысканные бокальчики имеют филигранно врезанную игольчатую бахрому по краю лепестков. Высота бахромчатых тюльпанов варьируют от 40 до 60 см. Оттенки бахромчатых тюльпанов в коллекции МЭБС разные, из белых тюльпанов известен сорт 'Honeymoon', среди желтых сортов 'Crystall Star', 'Fringed Elegans'. Необыкновенными фиолетовыми цветками обладают сорта 'Blue Hiron' и 'Bulldog'. **Также в коллекции имеются двухцветные бахромчатые тюльпаны**, сорт 'New Santa' красного оттенка с белым бахромой и сорт 'Housten Bosch' белый с нежно-розовой каймой по краям лепестков. Бахромчатые тюльпаны цветут с 14 по 20 апреля, продолжительностью 8-13 дней.

Класс 8 – Зеленоцветковые тюльпаны. В отдельный класс выделен в 1981 году. Получены от скрещивания старинного сорта тюльпанов Вирифлора с Дарвиновыми гибридами. В классе 1,5% всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС 6 сортов данного класса: Yellow Spring Green, 'Green Spring', 'Violet Bird', 'Flozoza', 'Doll's Minuet', 'Esperanto'.

Высота растений 30-50 см. Цветки зеленоцветных тюльпанов характеризуются зеленой полосой снаружи лепестков, края лепестков розового цвета. Цветут зеленоцветковые тюльпаны одновременно с лилиецветными тюльпанами. Начало цветения приходится на 16-19 апреля, продолжительность цветения составляет 8-10 дней.

Класс 9 – Рембранд. В коллекции МЭБС сортов данного класса нет.

Класс 10 – Попугайные тюльпаны. Известны с XVII века. **Произошли как споровые отклонения** от сортов различных классов. В классе 3,4% всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 13 сортов этого класса: 'Silver Parrot', 'Estella Rijnveld', 'Parrot

Prince', 'Apricot Parrot', 'Blumex', 'Red Lizard', 'Flaming Parrot', 'Irene Parrot', 'Texas Gold', 'Madonna', 'La Courtine', 'Blue Parrot', 'Green Wave'.

Высота растений достигает от 30 до 50 см. Цветки крупные и декоративные, лепестки волнистые, изрезанные, раскрытые цветки достигают 9-12 см в диаметре. Фаза цветения отмечено только у 4-х сортов, и они имеют одноцветные – желтые ('Texas Gold') и двуцветные ('Flaming Parrot', 'Green Wiew', 'Irene Parrot') окраски. Попугайные тюльпаны начинают цвести с 10 апреля в аридных условиях Мангистау.

Класс 11 – Махровые поздние тюльпаны. В культуре с XVII века. В классе 3,2% всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 16 сортов этого класса: 'Belicia', 'Blue Spectacle', 'Mount Tacoma', 'Orange Princess', 'Cartouche', 'Angelique', 'Blue Wow', 'Ice Cream', 'Akebono', 'Gudoshnik Double', 'Charming Lady', 'Golden Nizza', 'Pebble', 'Wedding Gift', 'Carnaval de Nice', 'Black Hero'. Высота растения от 30 до 60 см. Цветы имеют большое количество лепестков, цветок формой и величиной напоминает густомахровый пион. Размер цветка 6-8 см в высоту и 8-10 см в диаметре, чашевидной формы с прочным цветоносом. Фаза цветения зафиксирована только из 8 сортов данной группы. Окрас цветка разнообразный: розовый ('Wedding Gift'), красно-оранжевый ('Monte Orange', 'Willem Van Orange', 'Pebble', 'Golden Nice', 'Gudoshnik Double'), белый с красными полосами ('Carnaval de Nice'), кремовый с розовыми штрихами ('Charming Lady'). Цветут махровые поздние тюльпаны почти одновременно с Триумф-тюльпанами и Дарвиновыми гибридами, цветки распускаются в середине апреля и цветут на протяжении 10-15 дней. Они долго не увядают.

4 группа. Виды тюльпанов и их гибриды

Класс 12 – Тюльпан Кауфмана, его разновидности и гибриды. В самостоятельный класс выделен в 1960 году. В классе 2,9% сортов всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 3 сорта этого класса: 'Pink Dwarf', 'Ancilla', 'Shakespeare'. В начальные годы интродукции у тюльпанов Кауфмана не образовали генеративные почки.

Класс 13 – Тюльпан Фостера, его разновидности и гибриды. В самостоятельный класс выделен в 1960 году. В классе 3,5% сортов всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 2 сорта этого класса: 'Zizu', 'Purissima Design'. В годы исследова-

ний цвел сорт 'Purissima Design' данного класса. Цветение отмечено в первой декаде апреля, образуя белый цветок с легким желтым оттенком. Высота растений 32 см, цветки крупные, бокаловидной формы, 10 см в диаметре

Класс 14 – Тюльпан Грейга, его разновидности и гибриды. В самостоятельный класс выделен в 1960 году. В этот класс вошли все природные формы тюльпана Грейга и его гибриды с тюльпанами Кауфмана, Фостера и их садовыми формами. В классе 9,7% всего ассортимента [21-26].

В коллекции МЭБС имеет 6 сортов этого класса: 'Mary Ann', 'Plezir', 'Bella Vista', 'Authority', 'Jockey Cap', 'Double Red Riding Hood'. Гибриды тюльпана Грейга в основном низкорослые, высота растений 20-30 см. Одной из отличительных особенностей тюльпанов Грейга является крапчатость листьев. Листья по верхней стороне украшены коричнево-фиолетовыми пятнами различной формы. Цветки крупные, бокаловидные, имеют яркую, насыщенную окраску.

Фаза цветения отмечено только из 3 сортов данной группы. В коллекции имеются сорта красного ('Double Red Riding Hood') тона, а также сорта с двухцветной окраской – внутри белые, снаружи красные с белой каймой ('Authority'), белые, в центре розовые ('Jockey Cap'). Наиболее раннее цветение в этой классе наступило у тюльпанов 'Authority', 'Jockey Cap' – в первой декаде апреля (02.04) и продолжалось почти до середины апреля (14.04). В середине апреля начали цвести 'Double red riding hood'. Общая продолжительность цветения составляет 10-12 дней.

Таким образом, все привлеченные сорта тюльпанов показали высокую приспособляемость. У 52% сортов тюльпанов отмечено все фазы вегетативного и генеративного развития, а у остальных 73 сортов генеративных фаз развития не наблюдалось, так как привлечены детками. Все они не повреждаются болезнями и вредителями. Интродуцированные тюльпаны в аридных условиях Мангышлака при благоприятных условиях успешно произрастают, показывают высокую декоративность и перспективность для внедрения в озеленение.

Для оценки перспективности тюльпанов по Региональной шкале были выбраны 50 сортов из 11 классов. Структурно разработанная региональная шкала для сортов тюльпанов (и других луковичных) включает 11 диагностических признака (табл. 1), разбитых на три раздела:

1) биологическая устойчивость;

- 2) декоративно-габитуальные свойства;
3) репродуктивная способность.

Толерантность интродуцентов к условиям среды обитания складывается как сумма баллов их засухо- и фитофагоустойчивости, а также устойчивости цветка воздействию внешних факторов среды обитания. Оценочные параметры приведены в шкале в порядке уменьшения их значимости в формировании общей устойчивости. Максимальное число оценочных баллов-30.

При оценке декоративно-габитуальных свойств учитывается окраска, размер, форма и махровость цветка, продолжительность цветения, прочность цветоноса, окраска листа. Максимальное число оценочных баллов-55.

Репродуктивная способность диагностируется на основе учета успешности возобновления растений в условиях культуры вегетативным способом. На неё выделено 15 баллов общей суммы шкалы.

Таблица 1 – Комплексная шкала оценки перспективности тюльпанов (и других луковичных растений) в аридных условиях Мангистау

№ признака	Показатель, признак	Оценочные варианты и условия	Оценка в баллах
<i>1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ</i>			
1.1	Засухоустойчивость (для всего растения)	- очень низкая (в сухой жаркий период сильно снижается декоративность и прирост побегов интродуцентов, отмечается значительное пожелтение и даже хлорозная окраска листьев и осыпание бутонов – до 70-80%; некоторые экземпляры погибают)	0
		- низкая (в сухой жаркий период заметно снижается декоративность и прирост побегов интродуцентов, значительно падает тургор листового аппарата, отмечается пожелтение листьев и осыпание бутонов – до 50%)	3
		- средняя (в сухой жаркий период снижается декоративность и прирост побегов, тургор листового аппарата снижается днем и медленно восстанавливается только поздно вечером и в утренние часы, отмечается незначительное осыпание бутонов)	7
		- высокая (растение слабо реагируют на сухой жаркий период, имеют нормальный прирост побегов, характерную для таксона окраску листьев, тургор листового аппарата может снижаться днем при максимуме температур и солнечной инсоляции, но быстро восстанавливается в вечерние и утренние часы)	10
		- очень высокая (растение практически не реагируют на сухой жаркий период, имеют нормальный прирост побегов, характерную для таксона окраску листьев, хорошо держат тургор листового аппарата)	14
1.2	Фитофаго-устойчивость	- высокая (растение не повреждается вообще вредителями и болезнями или повреждается не более 10% анатомических органов)	8
		- средняя (повреждаемость по максимуму составляет 11-25% поверхности габитуса, сильно пораженные органы не встречаются)	5
		- низкая (повреждаемость по максимуму составляет 25-50% поверхности габитуса, встречаются сильно пораженные органы)	2
		- очень низкая (зачастую растения сильно поражается, что приводит к гибели свыше 50% их количества)	0

№ признака	Показатель, признак	Оценочные варианты и условия	Оценка в баллах
1.3	Устойчивость цветка к кратковременному воздействию внешних факторов среды обитания (перепады температур, высокая инсоляция, сильные ветра и пыльные бури и др.)	не реагирует по морфологическим признакам строения цветка	8
		слабо реагируют (сорта и формы, имеющие плотную текстуру лепестков, невыгорающая окраска)	5
		реагируют в средней степени (при низкой влажности воздуха, высокой температуре незначительно видоизменяются лепестки, или цветки деформируются, или повреждаются порывами сильного ветра)	3
		реагируют в сильной степени (при низкой влажности воздуха, высокой температуре заметно видоизменяются лепестки, цветки сильно деформируются, повреждаются порывами слабого ветра, выгорают при высокой солнечной инсоляции)	1
		реагируют в очень сильной степени (цветки подгорают, высыхают и даже погибают полностью, их структура не восстанавливается)	0
		ИТОГО:	0-30
<i>II. ДЕКОРАТИВНО – ГАБИТУАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА</i>			
2.1	Окраска цветка	- чистые яркие тона, от 2-х и более цветов	12
		- чистые яркие тона, одноцветные	10
		- основные тона и полутона выражены со средней яркостью	7
		- окраска тусклая, полутона не ярко выражены	3
		- окраска размытая, полутона не просматриваются	0
2.2	Размер цветка	- диаметр цветка более 12 см	7
		- 10-12 см	4
		- 8-10 см	2
		- 5-8 см	1
		- менее 5 см	0
2.3	Форма цветка	- оригинальная (лилиецветная, бахромчатая, попугайная и др.)	7
		- строгая правильная (чашевидная, бокаловидная и др.)	5
		- правильность строения и оригинальные признаки средне выражены	3
		- форма цветка имеет изъяны строения, заметные только при ближайшем рассмотрении	1
		- форма цветка имеет изъяны строения, снижающие значительно его декоративность	0
2.4	Махровость цветка (увеличенное количество лепестков)	- явно выражено (лепестки равномерно наполняют цветок)	7
		- достаточно выражено (равномерность наполнения цветка лепестками просматривается)	5
		- – анемоновидные (махровость в центре цветка)	3
		- лепестков не более двух рядов	2
		- цветки с отдельными лепестками	1
		- не проявляется	0

№ признака	Показатель, признак	Оценочные варианты и условия	Оценка в баллах
2.5	Продолжительность цветения, дней	- менее 5	0
		- 5-10	4
		- 10-15	8
		- более 15	10
2.6	Прочность цветоноса	высокая (удерживает цветок статично в период всей вегетации и сильные ветра)	5
		средняя (удерживает цветок статично в период всей вегетации, но в сильные ветра или при другом механическом воздействии может отклониться от естественного положения)	3
		слабая (положение цветка может безвозвратно измениться как к концу вегетации, так и от ветра и других внешних факторов)	0
2.7	Окраска листа	- пестрая, оригинальная или ярко-зеленая	7
		- темно-зеленая	5
		- серовато-зеленая, более тусклые оттенки зеленого тона	3
		- бледно-зеленая, тусклые оттенки	1
		- зеленовато-желтые, размытые тона	0
		ИТОГО:	0-55
III. РЕПРОДУКТИВНАЯ СПОСОБНОСТЬ			
3.1	Размножается вегетативно	очень хорошо	15
		хорошо	12
		удовлетворительно	8
		плохо	3
		не размножается	0
		ИТОГО:	0-15
		ВСЕГО:	0-100

По результатам данным, установлено, что все сорта тюльпанов в аридных условиях Мангистау отличаются высокой засухоустойкостью [27]. **Выпадов в насаждениях, повреждений луковиц** в течение летнего периода за годы исследований не отмечено.

Определялась поражаемость тюльпанов грибными болезнями. В результате у всех интродуцентов отсутствовали болезни.

Окраска цветка является одним из доминирующих признаков оценки сортов *Tulipa L.* и определяется основной колористический аспект цветочной композиции. Высшую оценку по этому признаку получили 22 сорта: 'Aleksandr Pushkin', 'Happy Generation', 'Toyota', 'Zurel', 'Green Wave', 'Madonna', 'Gudoshnik Double', 'Huis Ten Bosch' и др.

Размер цветка является стабильной, характерной особенностью сорта и особо не влияет на сортооценку. По нашему мнению, крупные цветки создают большой декоративный эффект, поэтому при оценке сорта предпочтение отдано сортам с крупными цветками. Наиболее крупные и махровые цветки (до 12 см в диаметре) отмечены у сорта махровых ранних и махровых поздних тюльпанов: 'Monte Orange', 'Willem Vam Oranje', 'Akebono', 'Golden Nizza', 'Gudoshnik Double', 'Wedding Gift'.

При оценке формы цветка наибольшие баллы имели сорта классов бахромчатых, лилиецветных и попугайных тюльпанов.

В условиях Мангистау у 57% изученных сортов продолжительность цветения составляла 10-15 дней. Если начало цветения тюль-

панов зафиксировано до 15 апреля, то продолжительность цветения длилась более 10 дней. При наступлении устойчивых теплых дней продолжительность цветения сокращалась до 10 дней.

По прочности цветоноса для классов лилиецветных тюльпанов характерны тонкие цветоносы, чем для остальных сортов класса.

Тюльпан Грейга, его разновидности и гибриды отличался сизо-зелеными матовыми листья-

ми, на которых расположены продольные коричнево-пурпурные полосы. Листья этого тюльпана декоративны сами по себе и могут украшать растение уже после окончания цветения.

В результате проведенной нами оценки интродуцированных сортов тюльпанов изученный сортимент по перспективности использования в декоративном цветоводстве был разделен на 4 группы: средняя, повышенная, высокая и очень высокая (табл. 2).

Таблица 2 – Распределение сортов тюльпанов по группам перспективности по Региональной шкале

Группа и индекс перспективности (сумма оценочных баллов)	Сорта	Количество таксонов
I – не представляющие ценности (0-10)	-	0
II – крайне низкая (11-20)	-	0
III – очень низкая (21-30)	-	0
IV – низкая (31-40)	-	0
V – пониженная (41-50)	-	0
VI – средняя (51-60)	Weisse Berliner, Candy Prince, Maureen, Purissima Design	4
VII – повышенная (61-70)	Aleksandr Pushkin, Казахстан, Andre Citroen, Cape Town, Denmark, Don Quichotte, Happy Generation, Zurel, Ollioules, Queen of Night, Alladin, Balerina, Jazz, Claudia, Purple Dream, Blue Heron, Bulldog, Crystal Star, Honeymoon, Huis Ten Bosch, Carnaval de Nice, Pebble, Authority, Double Red Riding Hood	24
VIII – высокая (71-80)	Monte Orange, Willem Vam Oranje, Atilla, Ben Van Zanten, Jan Reus, Jan Van Nes, Toyota, Banja Luka, Golden Parade, Hakuun, Salmon Impression, Green Wave, Irene Parrot, Flaming Parrot, Texas Gold, Golden Nizza, Wedding Gift	17
IX – очень высокая (81-90)	Akebono, Gudoshnik Double, Jokey Cap, New Santa, Президент Назарбаев	5
X – максимально высокая (эталонная) (91-100)	-	0
Всего:		50

По результатам исследований выявлено 4 сорта тюльпанов средней перспективности (51-60 баллов), имеющие низкие декоративные качества. Ими являются ‘Candy Prince’ из классов Простых ранних, 2 сорта – ‘Weisse Berliner’, ‘Maureen’ из Простых поздних и ‘Purissima Design’ из класса Тюльпан Фостера.

К повышенным перспективным (менее 70 баллов) для культивирования в условиях Мангистау отнесено 24 сорта, имеющих средние декоративные качества по устойчивости цветка к внешним факторам, по размеру, окраску,

формам и махровости цветка. Ими являются сорта тюльпанов 7 классов: Триумф-тюльпан 8 сортов – ‘Aleksandr Pushkin’, ‘Казахстан’, ‘Andre Citroen’, ‘Cape Town’, ‘Denmark’, ‘Don Quichotte’, ‘Happy Generation’, ‘Zurel’; Дарвиновы гибриды 1 сорт – ‘Ollioules’; Махровые поздние тюльпаны 2 сорта – ‘Carnaval de Nice’, ‘Pebble’; Простые поздние 1 сорт – ‘Queen of Night’; Лилиецветные 5 сортов – ‘Alladin’, ‘Balerina’, ‘Jazz’, ‘Claudia’, ‘Purple Dream’; Бахромчатые 5 сортов – ‘Blue Heron’, ‘Bulldog’, ‘Crystal Star’, ‘Honeymoon’, ‘Huis Ten Bosch’;

Тюльпаны Грейга и их разновидности 2 сорта – ‘Authority’, ‘Double Red Riding Hood’.

Из изученного ассортимента выявлено 17 сортов с высокой перспективностью (71 -80 баллов), которые имеют такие декоративные качества как яркая, двухцветная окраска, оригинальная форма и махровость цветка, прочность цветоноса. Данная группа перспективности включает 2 сорта (‘Monte Orange’, ‘Willem Van Oranje’) Махровых ранних тюльпанов, 5 сортов (‘Atilla’, ‘Ben Van Zanten’, ‘Jan Reus’, ‘Jan Van Nes’, ‘Toyota’) из классов Триумф-тюльпана, 4 сорта (‘Banja Luka’, ‘Golden Parade’, ‘Hakuun’, ‘Salmon Impression’) Дарвиновы гибриды, 4 сорта (‘Green Wave’, ‘Irene Parrot’, ‘Flaming Parrot’, ‘Texas Gold’) Попугайных тюльпанов, 2 сорта (‘Golden Nizza’, ‘Wedding Gift’) Махровых поздних тюльпанов.

К очень высокоперспективным (81-90 баллов) для Мангистау отнесено 5 сортов, имеющих комплекс ценных признаков по устойчивости цветка к внешним факторам, яркой окраске, оригинальной форме цветка, обильному и продолжительному цветению и сравнительно низкой поражаемости вредителями и болезнями. Ими являются 1 сорт бахромчатых тюльпанов – ‘New Santa’, 2 сорта Тюльпаны Грейга и их разновидности – ‘Jokey Cap’, ‘Президент Назарбаев’, 2 сорта Махровые поздние тюльпаны – ‘Akebono’, ‘Gudoshnik Double’.

Выводы

Таким образом, все привлеченные сорта тюльпанов показали высокую приспособляемость. У 52% (79) сортов тюльпанов отмечено все фазы вегетативного и генеративного развития, а у остальных 73 сортов генеративных фаз развития не наблюдалось, так как привлечены детками. Все они не повреждаются болезнями и вредителями.

Также, разработанная региональная шкала позволяет производить более объективный и направленный отбор лучших для использования в декоративном садоводстве сортов тюльпанов в зависимости не только от их групповой принадлежности, но и показателей биологической устойчивости, декоративных качеств и репродуктивности. В результате проведенной комплексной оценки выявлено 4 «средних», 24 «повышенных», 17 «высокоперспективных» и 5 «очень высокоперспективных» сортов тюльпанов, которые позволяют создавать из них декоративные цветочные композиции различных типов в условиях аридной зоны Мангистау.

Исследования выполнены в рамках выполнения грантового проекта по теме «Интродукция перспективных сортов и форм цветочно-декоративных растений в условиях Мангистау для сохранения их биоразнообразия и широкого введения в практику зеленого строительства №AP05135654».

Литература

- 1 Дуйсенова Н.И., Иманбаева А.А., Лесниченко В.И., Темирбаева К. Результаты интродукции сортов тюльпанов в аридных условиях Мангышлака // Сборник научных трудов ГНБС. – 2017. – Т. 145. – С. 59-63.
- 2 Байрамова Г., Белозёров И.Ф., Гурина Т.Ф., и др. Каталог растений Мангышлакского экспериментального ботанического сада / Под редакцией Косарева О.Н. – Актау, 1994. – 149 с.
- 3 Иманбаева А.А., Косарева О.Н., Лесниченко В.И., и др. Каталог растений Мангышлакского экспериментального ботанического сада / Под редакцией А.А. Иманбаевой. – Актау, 2009. – 136 с.
- 4 Иманбаева А.А., Дуйсенова Н.И., Лесниченко В.И., и др. Каталог декоративных растений для озеленения Мангистауской области / Под редакцией А.А. Иманбаевой. Актау, 2012. – 73 с.
- 5 Иманбаева А.А., Косарева О.Н., Дуйсенова Н.И., и др. Коллекция растений Мангышлакского экспериментального ботанического сада. / Под редакцией А.А. Иманбаевой – Актау, 2017. – 152 с.
- 6 Байтулин И.О., Бессчетнова М.В., Ляшенко Н.В. Цветы родной земли: монография. А.-Ата: Кайнар, 1981. – 144 с.
- 7 Sitpayeva G.T., Vesselova P.V., Koudabayeva G.M. Tulipes sauvages du Kazakhstan // Hommes and plantes. – 2011. – N 79. – P. 36-41.
- 8 Иващенко А. Тюльпаны и другие луковичные растения Казахстана. Алматы: Две столицы, 2005. – 192 с.
- 9 Scheepen J. Classified List and International Register of Tulip Names. KAVB, 1996. – 632 p.
- 10 Everett D. The genus Tulipa. Tulips of the World. Kew Publishing, 2013. – P. 158.
- 11 Maarten J.M., Christenhusz FLS, Govaerts R. Tiptoe through the tulips – cultural history, molecular phylogenetics and classification of Tulipa (Liliaceae) // Botanical journal of the Linnean Society. – 2013. – 172 (3). – P. 280-328.
- 12 Judith A. Lesnaw and Said A. Ghabrial. Tulip Breaking: Past, Present and Future // The American Phytopathological Society. Plant Disease. – 2000. – Vol. 84, No.10. – P. 1052-1060.
- 13 Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР // Методики интродукционных исследований в Казахстане. Алма-Ата: Наука, 1987. – С. 4-11.
- 14 Методики интродукционных исследований в Казахстане / Под ред. М.А. Проскурякова. – А.-Ата. – 1987. – 136 с.

- 15 Рекомендации по мелиорации почв, зеленому строительству и сельскохозяйственному освоению полуострова Мангышлак. – Шевченко. – 1976. – 45с.
- 16 Карписонова Р.А. Цветоводство: Научно-популярное издание. М.: Кладезь-Букс, 2007. – 254 с.
- 17 Карписонова Р.А., Бочкова И.Ю. Культурная флора травянистых декоративных многолетников средней полосы России: Атлас. М.: Фитон+, 2011. – 432 с.
- 18 Былов В.Н. Основы сравнительной сортооценки декоративных растений // Интродукция и селекция цветочно-декоративных растений. – М.: Наука, 1978. – С.7-32.
- 19 Тыщенко Е.Л., Тимкина Ю.В. Методические аспекты оценки декоративных признаков гибискуса сирийского (*Hibiscus syriacus* L.) // Политематический сетевой Научный журнал Кубанского Государственного аграрного университета. – 2011. – № 66(02). – С. 5-17.
- 20 Иманбаева А.А., Белозеров И.Ф. Комплексная шкала диагностики интродукционной ценности растений в аридных условиях Мангыштау // Вестник НАН Белоруси. Сер.биологических наук. – 2017. – № 2. – С.78-86.
- 21 Смирнов И.А. Методика определения перспективности интродукции древесных растений. Майкоп, 1989. – 34 с.
- 22 Малова Н. Тюльпаны. М.: ОЛМА-ПРЕСС, 2001. – 96 с.
- 23 Zonneveld J.M. The systematic value of nuclear genome size for «all» species of *Tulipa* L. (Liliaceae). // *Plant Systematics and Evolution*, 2009. – Vol. 281. – P. 217.
- 24 Veldkamp J.F., Zonneveld B.J.M. The infrageneric nomenclature of *Tulipa* (Liliaceae). // *Plant Systematics and Evolution*. – 2011. – Vol. 298. – P. 87.
- 25 Botschantzeva Z.P. Tulips. Taxonomy, morphology, cytology, phytogeography and physiology. / Translated and edited by H.Q. Verekamp. – Rotterdam, 1982. – 236 p.
- 26 Straley G.B., Utech F.H. *Tulipa*. // *Flora of North America*. – 2003. – Vol. 26. – p. 199.
- 27 Пятницкий С.С. Оценка селекционного материала по засухо-устойчивости. // Практикум по лесной селекции. М., 1961. – С. 78-102.

References

- 1 Bajtulin I.O., Besschetnova M.V., Lyashenko N.V. (1978). *Cvety rodnoj zemli* [Flowers of the native land]. “Kajnar”, 144 p.
- 2 Bayramova G., Belozarov I.F., Gurina T.F. (1994) *Katalog rastenij Mangyshlaxskogo ehksperimental'nogo botanicheskogo sada* [Catalog of plants of Mangyshlak experimental botanical garden] / Pod redakciej Kosarevoj O.N., 149 p.
- 3 Botschantzeva Z.P. (1982) *Tulips. Taxonomy, morphology, cytology, phytogeography and physiology.* / Translated and edited by H.Q. Verekamp. Rotterdam, 236 p.
- 4 Bylov V.N. (1978) *Osnovy sravnitel'noj sortoocenki dekorativnyh rastenij* [Basics of comparative variety estimation of ornamental plants] // *Introdukciya i selekciya cvetochno-dekorativnyh rastenij*. “Nauka”, pp. 7-32.
- 5 Duisenova N.I., Imanbaeva A.A., Lesnichenko V.I., Temirbaeva K. (2017) *Rezultaty introdukcii sortov tyul'panov v aridnyh usloviyah Mangyshlaka* [Results of the introduction of tulip varieties in the arid conditions of Mangyshlak] // *Sbornik nauchnyh trudov GNBS*, vol.145, pp. 59-63.
- 6 Everett D. (2013) *The genus Tulipa. Tulips of the World.* Kew Publishing, P. 158.
- 7 Imanbayeva A.A., Belozarov I.F. (2017) *Kompleksnaya shkala diagnostiki introduktsionnoy tsennosti rasteniy v aridnykh usloviyakh Mangistau* [Complex scale of diagnostics of the plant introduction value in arid conditions of Mangistau] // *Vestnik NAN Belorusi. Ser.biologicheskikh nauk*, vol. 2, pp. 78-86.
- 8 Imanbayeva A.A., Duisenova N.I., Lesnichenko V.I. (2012) *Katalog dekorativnykh rasteniy dlya ozeleneniya Mangistauskoy oblasti* [Catalog of ornamental plants for landscaping Mangistau region] / Pod redaktsiyej A.A.Imanbayevoj, 73 p.
- 9 Imanbayeva A.A., Kosareva O.N., Duisenova N.I. (2017) *Kollekciya rastenij Mangyshlaxskogo ehksperimental'nogo botanicheskogo sada* [Plant collection of Mangyshlak Experimental Botanical Garden]. Pod redakciej A.A. Imanbaevoj, 152 p.
- 10 Imanbayeva A.A., Kosareva O.N., Lesnichenko V.I. (2009) *Katalog rastenij Mangyshlaxskogo ehksperimental'nogo botanicheskogo sada* [Catalog of plants of Mangyshlak experimental botanical garden] / Pod redakciej A.A. Imanbaevoj, 136 p.
- 11 Ivashchenko A. (2005) *Tyul'pany i drugiye lukovichnyye rasteniya Kazakhstana* [Tulips and other bulbous plants of Kazakhstan]. “Dve stolitsy”, 192 p.
- 12 Judith A. Lesnaw and Said A. Ghabrial (2000) *Tulip Breaking: Past, Present and Future* // *The American Phytopathological Society. Plant Disease*, vol. 84, No.10, pp. 1052-1060.
- 13 Karpisonova R.A. (2007) *Cvetovodstvo* [Floriculture]. “Kladez'-Buks”, 254 p.
- 14 Karpisonova R.A., Bochkova I.YU. (2011) *Kul'turnaya flora travyanistykh dekorativnyh mnogoletnikov srednej polosy Rossii. Atlas* [Cultural flora of herbaceous ornamental perennials in central Russia. Atlas.]. “Fiton+”, 432 p.
- 15 Maarten J.M., Christenhusz FLS, Govaerts R. (2013) *Tiptoe through the tulips – cultural history, molecular phylogenetics and classification of Tulipa (Liliaceae)* // *Botanical journal of the Linnean Society*, 172 (3), pp. 280-328.
- 16 Malova N. (2001) *Tul'pany* [Tulips]. “OLMA-PRESS”, 2001, 96 p.
- 17 *Metodika fenologicheskikh nablyudeniy v botanicheskikh sadakh SSSR* [Methods of phenological observations in the botanical gardens of the USSR] // *Metodiki introduktsionnykh issledovaniy v Kazakhstane* (1987). “Nauka”, pp. 4-11.
- 18 *Metodiki introduktsionnykh issledovaniy v Kazakhstane* [Methods of introduction studies in Kazakhstan] / Pod. red. M.A. Proskuryakova (1987), p. 136.
- 19 Pyatnitskiy S.S. (1961) *Otsenka selektsionnogo materiala po zasukhoustoychivosti* [Evaluation of breeding material for drought resistance] // *Praktikum po lesnoy selektsii*, pp. 78-102.

- 20 Rekomendacii po melioracii pochv, zelenomu stroitel'stvu i sel'skohozyajstvennomu osvoeniyu poluostrova Mangyshlak [Recommendations on soil reclamation, green building and agricultural development of the Mangyshlak Peninsula]. (1976), P. 45.
- 21 Scheepen J. (1996) Classified List and International Register of Tulip Names. "KAVB", 632 p.
- 22 Sitpayeva G.T., Vesselova P.V., Koudabayeva G.M. (2011) Tulipes sauvages du Kazakhstan // Hommes and plantes, vol. 79, pp. 36-41.
- 23 Smirnov I.A. (1989) Metodika opredeleniya perspektivnosti introdukcii drevesnykh rasteniy [Method of determining the prospects of introduction of woody plants]. Maykop, 34 p.
- 24 Straley G.B., Utech F.H. (2003) Tulipa. // Flora of North America, vol. 26, p. 199.
- 25 Tyshchenko E.L., Timkina YU.V. (2011) Metodicheskie aspekty ocenki dekorativnykh priznakov gibiskusa sirijskogo (*Hibiscus syriacus* L.) [Methodological aspects of the evaluation of decorative signs of Syriac hibiscus (*Hibiscus syriacus* L.)] // Politematicheskij setevoj Nauchnyj zhurnal Kubanskogo Gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, vol. 66(02). pp. 5-17.
- 26 Veldkamp J.F., Zonneveld B.J.M. (2011) The infrageneric nomenclature of Tulipa (Liliaceae). // Plant Systematics and Evolution, vol. 298, P. 87.
- 27 Zonneveld J.M. (2009) The systematic value of nuclear genome size for "all" species of Tulipa L. (Liliaceae). // Plant Systematics and Evolution, vol. 281, P. 217.

**Рахимова Е.В.¹, Ермакова Б.Д.², Кызметова Л.А.³,
Асылбек А.М.⁴, Сыпабеккызы Г.⁵**

¹e-mail: evrakhim@mail.ru

²e-mail: bdyermekova40@mail.ru

³e-mail: lyzka79@mail.ru

⁴e-mail: a-asema-89@mail.ru

РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

⁵Казахский национальный университет им. аль-Фараби,

Казахстан, г. Алматы, e-mail: gulnaz_92_21@mail.ru

МАЛОИЗВЕСТНЫЕ ВИДЫ РЖАВЧИНЫХ ГРИБОВ ЗАИЛИЙСКОГО АЛАТАУ: БИОЛОГИЯ, МЕСТОНАХОЖДЕНИЕ И КРУГ ХОЗЯЕВ

Сведения о ржавчинных грибах Заилийского Алатау не достаточны и значительно устарели (особенно таксономия видов). Поэтому целью работы было выявление малоизвестных видов ржавчинных грибов на территории Иле-Алатауского национального парка, описание их биологии и местонахождений, установление круга растений хозяев. Научная и практическая значимость работы заключается в получении данных о новых местонахождениях малоизвестных ржавчинных грибов, имеющих большое значение в развитии и размножении растений хозяев. Материалом для статьи служили собственные сборы авторов из района исследований. Приготовление препаратов осуществлялось по стандартной методике. Образцы изучались и фотографировались с помощью фотомикроскопа Polyvar с интерференционной оптикой Номарского.

Приведены оригинальные описания, конкретные местонахождения, круг хозяев и микрофотографии отдельных структур 7 малоизвестных видов ржавчинных грибов Заилийского Алатау: *Pucciniastrum pyrolae* на *Pyrola rotundifolia* и *Moneses uniflora*; *P. goodyerae* на *Goodyera repens*; *Hyalopsora polypodii* на *Cystopteris fragilis*; *Puccinia atragenicola* на *Atragene sibirica*; *Microppuccinia retecta* на *Anemonastrum protractum*; *Puccinia thesii* на *Thesium alatavicum*; *P. mougeotii* на *Thesium alatavicum*. Из 7 описанных малоизвестных видов только *Puccinia atragenicola*, *Microppuccinia retecta* и *Puccinia mougeotii* являются редкими. Вид *P. mougeotii* является редким и в других регионах. *Pucciniastrum pyrolae* и *P. goodyerae* встречаются достаточно часто, но в связи с мелкими размерами растений хозяев не всегда замечаются исследователями, тем более, что пятна поражения располагаются на нижней стороне листовой пластинки. Что же касается *Hyalopsora polypodii* на *Cystopteris fragilis*, то в связи с местообитаниями растения хозяина (под камнями), гриб редко собирается при микологическом обследовании. Ценность проведенного исследования и практическое значение заключаются в получении данных о новых местонахождениях малоизвестных ржавчинных грибов.

Ключевые слова: Заилийский Алатау, Иле-Алатауский национальный парк, местонахождение, растение-хозяин, ржавчинный гриб, телиостадия, урединиостадия, эциостадия.

Rakhimova E.V.¹, Ermekova B.D.², Kyzmetova L.A.³,
Assylbek A.M.⁴, Sypabekkyzy G.⁵

¹e-mail: evrakhim@mail.ru

²e-mail: bdyermekova40@mail.ru

³e-mail: lyzka79@mail.ru

⁴e-mail: a-asema-89@mail.ru

RSE "Institute of Botany and Phytointroduction" CS MES RK, Kazakhstan, Almaty

⁵Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty,

e-mail: gulnaz_92_21@mail.ru

Little-known species of rust fungi in Trans-ili Alatau: biology, location and host plants range

Information about rust fungi of Zailiyskiy Alatau is not sufficient and is considerably outdated (especially taxonomy of species). Therefore, the aim of the work was to identify little-known species of rust fungi on the territory of the Ile-Alatau national Park, a description of their biology and locations, the establishment of a circle of host plants. The scientific and practical significance of the work is to obtain data on the new locations of little-known rust fungi, which are of great importance in the development and reproduction of host plants. The material for the article was the authors' own collections from the research area. Preparation of preparations was carried out according to the standard technique. The samples were studied and photographed using a photomicroscope Polyvar with interference optics Nomarsky.

Given the description, location, host range and photomicrographs of selected structures of 7 little-known species of rust fungi the Trans-Ili Alatau: *Pucciniastrum pyrolae* on *Pyrola rotundifolia* and *Moneses uniflora*; *P. goodyerae* on *Goodyera repens*; *Hyalopsora polypodii* on *Cystopteris fragilis*; *Puccinia atragenicola* on *Atragene sibirica*; *Micropuccinia retecta* on *Anemonastrum protractum*; *Puccinia thesii* on *Thesium alatavicum*; *P. mougeotii* on *Thesium alatavicum*. Of the 7 little-known species described, only *Puccinia atragenicola*, *Micropuccinia retecta* and *Puccinia mougeotii* are rare. *P. mougeotii* is a rare species in other regions. *Pucciniastrum pyrolae* and *P. goodyerae* are quite common, but due to the small size of the host plants are not always seen by researchers, especially since the lesions are located on the lower side of the leaf blade. As for the *Hyalopsora polypodii* on *Cystopteris fragilis*, in connection with the habitats of the host plant (under stones), the fungus is rarely collected during mycological survey. The value of the study and practical value lies in obtaining data on new locations of little-known rust fungi.

Key words: Trans-Ili Alatau, Ile-Alatau national park, location, host-plant, rust fungus, teliospore, urediniospore, aeciospore.

Рахимова Е.В.¹, Еркекова Б.Д.², Кызметова Л.А.³,
Асылбек А.М.⁴, Сыпабеккызы Г.⁵

¹e-mail: evrakhim@mail.ru

²e-mail: bdyermekova40@mail.ru

³e-mail: lyzka79@mail.ru

⁴e-mail: a-asema-89@mail.ru

РМК «Ботаника және фитоинтродукция институты», ҚР БҒМ ҒК, Қазақстан, Алматы қ.

⁵Ал-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.,

e-mail: gulnaz_92_21@mail.ru

Іле Алатауы бойынша тат саңырауқұлақтарының аз зерттелген түрлері: биологиясы, табылған жері және иелік өсімдіктері

Іле Алатауының тат саңырауқұлақтары туралы мәліметтер жеткіліксіз және ескірген (әсіресе, таксономиялық түрлерге қатысты). Сондықтан да, зерттеудің мақсаты Іле-Алатауы ұлттық саябағы аймағындағы аз зерттелген тат саңырауқұлақтары түрлерін және олардың иелік өсімдіктерін анықтау, биологиясы мен табылған жерлерін сипаттау болып табылады. Жұмыстың ғылыми-тәжірибелік маңыздылығы тат саңырауқұлақтарының аз зерттелген түрлерінің жаңадан анықталған жерлері туралы мәліметтерге негізделеді, бұл деректер, иелік өсімдіктерінің дамуы мен көбеюінде үлкен маңызға ие. Мақала материалдары ретінде авторлардың зерттеу аймағы бойынша жүргізілген жеке жинақтары (гербарийлері) қолданылды. Препараттарды дайындау стандартты әдістер бойынша жүргізілді. Үлгілер Polyvar фотомикроскопында Номарский интерференциялық оптикасының көмегімен суретке түсіріліп, зерттелді.

Мақалада Іле Алатауы бойынша аз зерттелген 7 тат саңырауқұлақ түрлерінің бірегей сипаттамасы, нақты табылған жері, иелік өсімдіктері және жеке құрылымдарының микросуреттері келтірілген: *Pucciniastrum pyrolae* – *Pyrola rotundifolia* және *Moneses uniflora* өсімдіктерінде; *Pucciniastrum goodyerae* – *Goodyera repens*; *Hyalopsora polypodii* – *Cystopteris fragilis*; *Puccinia atragenicola* – *Atragene sibirica*; *Micropuccinia retecta* – *Anemonastrum protractum*; *Puccinia thesii* – The-

sium alatavicum; *Puccinia mougeotii* – *Thesium alatavicum* өсімдігінде. Анықталған 7 түрдің ішінде *Puccinia atragenicola*, *Microppuccinia relecta* және *Puccinia mougeotii* түрлері ғана сирек кездесетін түрлер қатарында. Ал, *Puccinia mougeotii* түрі басқа аймақтарда да сирек кездесетін түр болып табылады. *Pucciniastrum pyrolae* және *Pucciniastrum goodyerae* түрлері анағұрлым жиі кездеседі, бірақ иелік өсімдіктері көлемінің кіші болуына байланысты зерттеушілерге байқалмай қалып жатады, сондай-ақ, саңырауқұлақпен зақымдалу дақтары жапырақтарының төменгі бетінде орналасқан. *Cystopteris fragilis* өсімдігіндегі *Hyalopora polypodii* түріне келсек, иелік өсімдігінің тіршілік ортасына (тастардың асты) байланысты микологиялық зерттеу кезінде саңырауқұлақ сирек жиналады. Жүргізілген зерттеу жұмыстарының ғылыми-тәжірибелік маңыздылығы тат саңырауқұлақтарының аз зерттелген түрлерінің жаңадан таралу аймағына қатысты алынған мәліметтер болып табылады.

Түйін сөздер: Іле Алатауы, Іле Алатауы ұлттық саябағы, табылған жері, иелік-өсімдік, тат саңырауқұлағы, телиокезеңі, урединиокезеңі, эциокезеңі.

Введение

Заилийский Алатау – один из хребтов Северного Тянь-Шаня, расположенный в непосредственной близости от мегаполиса Алматы. На северном макросклоне Заилийского Алатау постановлением правительства республики Казахстан от 22 февраля 1996 года создан Иле-Алатауский государственный национальный природный парк (ИАГНПП) площадью 198 669 га для сохранения уникальных ландшафтов, растительного и животного мира. Флористическое разнообразие Северного Тянь-Шаня изучено достаточно хорошо, в опубликованных статьях отражено современное состояние видового состава Заилийского Алатау [1]. По микобиоте Заилийского Алатау, являющейся неотъемлемой составной частью экосистем, имеются две монографии, с момента выпуска которых прошло 50-60 лет. В монографии Г.С. Неводовского дано подробное описание 351 вида ржавчинных грибов, часть которых найдена в Заилийском Алатау [2]. В работе Б.К. Калымбетова [3], посвященной микобиоте Заилийского Алатау содержатся сведения о 249 видах ржавчинных грибов. Однако, эти сведения достаточно устарели (особенно таксономия видов), к тому же, автор включил в монографию виды, обитающие на сопредельных территориях хребтов Кетмень, Кунгей и др. Для многих видов грибов приведено всего одно-два местонахождения, что может быть связано как с редкостью данного вида, так и с его малой известностью. В последнем случае вид трудно обнаружить в силу каких-либо причин.

Целью нашей работы было выявить мало известные виды ржавчинных грибов на территории Иле-Алатауского национального парка и привести данные по их биологии, местонахождению в Заилийском Алатау и кругу растений хозяев.

Материалы и методы исследования

Материалом для статьи послужили собственные сборы авторов из района исследований. Микологические обследования проводились на территории Иле-Алатауского национального парка в течение ряда лет (2006, 2012-2018). Во время обследований собирались растения с типичными симптомами поражения ржавчиной. Приготовление препаратов осуществлялось по стандартной методике [4]. Образцы изучались и фотографировались с помощью фотомикроскопа Polyvar (**Reichert-Jung, Австрия**) с интерференционной оптикой Номарского. Виды были идентифицированы с помощью определителей ржавчинных грибов [2, 5].

Названия видов грибов и авторы приведены в соответствии с базой данных Index Fungorum [6], названия питающих растений – согласно Плантариум, определителю растений on-line [7]. Для всех мало известных видов грибов приведены оригинальные описания и точки конкретных местонахождений (с указанием даты сбора и фамилии коллектора).

Результаты исследования и их обсуждение

Одним из малоизвестных видов Заилийского Алатау является возбудитель ржавчины грушанки (*Pucciniastrum pyrolae* (J.F. Gmel.) J. Schröt.). Этот вид был впервые обнаружен в Казахстане на территории Катон-Карагайского национального парка в окрестностях пос. Берель в 2007 году на *Pyrola rotundifolia* L. [8]. Затем поражение отмечено еще дважды [9], так же на территории Катон-Карагайского национального парка (хр. Листвяга, выше пос. Берель, т. 124, выс. 968 м над ур. моря, N49°23'22.2", E086°25'58.5", 10.08.2015, Е.В. Рахимова; там же, в сторону

пос. Аршаты, т. 132, выс. 1137 м над ур. моря, N49°21'52.1", E086°27'51.9", 11.08.2015, Е.В. Рахимова). В 2012 году *Pucciniastrum pyrolae* обнаружен на новом хозяине – *Moneses uniflora* (L.) A. Gray. в Терской Алатау (ущ. Шогансай, 4 км от Баянкольской заставы, т. 186, выс. 2550 м над ур. моря, моховый ельник, склон больше 45°, N42°36'327", E079°57'190", 06.08.2012, Г.А. Нам). Из сопредельных территорий гриб был отмечен в Турции, на *Pyrola media* Sw. [10], в Пакистане [11] и Кыргызстане: в Баскоунской щели хр. Терской Алатау [12] и на территории Алайского хребта [13].

Урединии *Pucciniastrum pyrolae* образуются преимущественно на нижней стороне листовой пластинки грушанки и одноцветки или на обеих сторонах, рассеянные или группами, небольшие, округлые, чаще желтые, иногда буроватые, прикрытые плотным перидием и эпидермой хозяина. Урединиоспоры грушевидные, эллипсоидальные или удлинённые, (24-41 x 11-18) мкм, оболочка бесцветная, шиповатая (Рис. 1). Незаметные, плоские, подэпидермальные телии образуются на нижней стороне листовой пластинки. Телиоспоры одноклетные, продолговатые или столбчатые, (24-28 x 10-12) мкм, оболочка равномерной толщины, тонкая (около 1 мкм), бесцветная.

На территории Заилийского Алатау *Pucciniastrum pyrolae* был обнаружен в урединиостадии в следующих местообитаниях:

На *Pyrola rotundifolia* L., ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон северо-западной экспозиции, еловый лес, т. 291, 2563 м над ур. моря, N43°03'39.4", E76°59'25.3", 02.08.2018, Л.А. Кызметова; там же, склон северной экспозиции, еловый лес, т. 300, 2365 м над ур. моря, N43°04'10.1", E76°59'25.3", 07.08.2018, У.К. Джетигонова.

На *Moneses uniflora* (L.) A. Gray., ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон северной экспозиции, еловый лес, т. 300, 2365 м над ур. моря, N43°04'10.1", E76°59'25.3", 07.08.2018, У.К. Джетигонова.

Таким же малоизвестным видом является возбудитель ржавчины гудайеры *Pucciniastrum goodyerae* (Tranzschel) Arthur. Вид был впервые обнаружен в Казахстане в 2012 году (хр. Заилийский Алатау, ниже пика Юный геолог, ельники, выс. 2513 м. над ур. моря, N43°06'87.9", E076°59'19.0", 18.07.2012, Е.В. Рахимова). Из сопредельных территорий гриб был отмечен в Российской Федерации [5].

Урединии *Pucciniastrum goodyerae* образуются на обеих сторонах листовой пластинки гудайеры, но преимущественно на верхней стороне. Пятна поражения бледные. Урединии округлые, буровато-желтые, покрытые полушаровидным перидием, клетки устья перидия утолщенные, тонко-шиповатые. Урединиоспоры продолговатые, яйцевидные или грушевидные, (22-36 x 12-20) мкм, с желтоватым содержимым (Рис. 2), оболочка урединиоспор 1,5-2 мкм толщиной, шиповатая, бесцветная или желтая.

На территории Заилийского Алатау *Pucciniastrum goodyerae* был обнаружен в урединиостадии в следующих местообитаниях:

На *Goodyera repens* (L.) R. Br., ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон северо-западной экспозиции, еловый лес, т. 291, 2563 м над ур. моря, N43°03'39.4", E76°59'25.3", 02.08.2018, Л.А. Кызметова; там же, склон северной экспозиции, еловый лес, т. 300, 2365 м над ур. моря, N43°04'10.1", E76°59'25.3", 07.08.2018, У.К. Джетигонова.

Цикл развития малоизвестного гриба *Hyalospora polypodii* (Pers.) Magnus недостаточно изучен. Спермогонии и эции не известны [14], телиоспоры в Казахстане пока не обнаружены. Урединиостадия была зарегистрирована на *Cystopteris dickieana* R. Sim. (ВКО, Бухтарминские горы, северо-западный склон, скальный массив, в замшелой трещине, 23.06.2014, Ю.А. Котухов) и на *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh. (Улу-Тау; Заилийский Алатау, Малое Алматинское ущелье, северный склон Крестовой горы, 1300 м над ур. моря, 16.05.1946, М.Н. Кузнецова; там же, Большое Алматинское ущелье, ельники, 2000 м над ур. моря, 16.05.1946, М.Н. Кузнецова; там же, Иссыкская щель, 1800 м над ур. моря, 25.07.1946, М.Н. Кузнецова. Из сопредельных территорий гриб был отмечен на *Cystopteris fragilis* в Турции [10], в Узбекистане [15], Туркмении [13], Таджикистане, Российской Федерации [5].

Урединии на нижней стороне вайи, без перидия, на краю иногда можно отметить парафизы, разрывающие эпидерму. Урединиоспоры двух типов (Рис. 3, 4): урединиоспоры первого типа продолговато-эллипсоидальные, часто неправильные, угловатые или согнутые, (22,5-35,0 x 15,0-20,0) мкм, оболочка бесцветная, со слабыми бородавочками. Урединиоспоры второго типа коротко-эллипсоидальные, (29,5-36,5 x 19,0-27,5) мкм, оболочка чуть толще (до 2 мкм).



Рисунок 1 – Урединиоспоры *Pucciniastrum pyrolae*, шкала – 15 мкм (световая микроскопия)

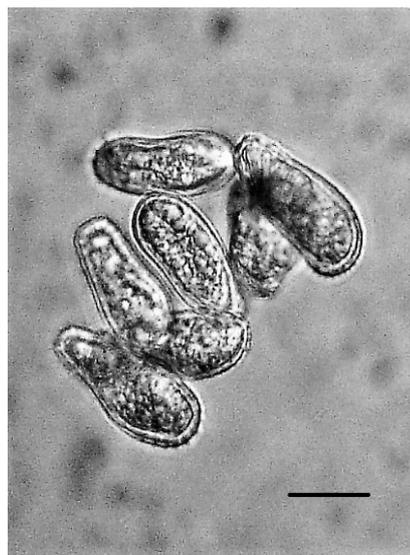


Рисунок 2 – Урединиоспоры *Pucciniastrum goodyerae*, шкала – 15 мкм (световая микроскопия)

На территории Заилийского Алатау *Hyalop-sora polypodii* был обнаружен в урединиостадии в следующих местообитаниях:

На *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh., Заилийский Алатау, ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон северо-западной экспозиции, еловый лес, т. 291, 2563 м над ур. моря, N43°03'39.4", E76°59'25.3", 02.09.2018, Л.А. Кызметова, там же, склон западной экспозиции, еловый лес, т. 297, 2563 м над ур. моря, N43°03'28.9", E76°59'18.3", 05.09.2018, Е.В. Рахимова, там же, склон северной экспозиции, еловый лес, т. 301, 2377 м над ур. моря, N43°04'08.5", E76°59'27.2", 09.09.2018, Е.В. Рахимова; там же, ущ. Аюсай, склон юго-восточной экспозиции, еловый лес, т. 304, 1831 м над ур. моря, N43°05'43.4", E76°56'44.9", 27.08.2018, А.М. Асылбек; там же, склон восточной экспозиции, еловый лес, т. 308, 1888 м над ур. моря, N43°05'18.4", E76°56'46.2", 28.08.2018, А.М. Асылбек.

В Казахстане на княжике ежегодно отмечается развитие эцидиальной стадии *Puccinia recondita* Dietel & Holw. На крупных мозолистых вздутиях черешков и листьев. Значительно реже встречается малоизвестный вид возбудителя ржавчины *Puccinia atragenicola* (Bubák) P.Syd. & Syd. Из сопредельных территорий гриб был отмечен на *Atragene sibirica* в Кыргызстане, в бассейне реки Чон-Курчак [16, 17] и в российской федерации [5]. На территории Китая на

различных видах рода *Clematis* (*Atragene*) обнаружен другой возбудитель ржавчины – *Puccinia atragenes* W. Hausm. [18].

Округлые, плотные, черные телии *Puccinia atragenicola* образуются на нижней стороне листовой пластинки княжика на желтых или коричнево-желтых пятнах. Телиоспоры (Рис. 5) двуклетные, булабовидные, (55,0-76,5 x 17,5-24,0) мкм, на вершине чаще плоские, иногда закругленные, у перегородки слабо перетянутые, гладкие, прозрачно-бурые, с зернистым содержимым, на вершине утолщенные до 10,5-12,0 мкм, ножка короткая, коричневая, толстая.

На территории Заилийского Алатау *Puccinia atragenicola* была обнаружена в телиостадии в следующих местообитаниях:

На *Atragene sibirica* L., Заилийский Алатау, ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон юго-восточной экспозиции, еловый лес, т. 286, 2407 м над ур. моря, N43°04'00.6", E76°59'14.7", 31.08.2018, У.К. Джетигенова.

Виды рода *Anemonastrum* в Казахстане поражаются малоизвестным ржавчинным видом *Micropuccinia resecta* (Syd. & P. Syd.) Arthur & H.S. Jacks. Из сопредельных территорий гриб был отмечен на *Anemonastrum protractum* в Джумгальском районе (Внутренний Тянь-Шань) Кыргызстана (растение-хозяин не указан) [19, 20], в Таджикистане (Гиссарский хребет) [13] и Кыргызстане (Алайский хребет) [5].

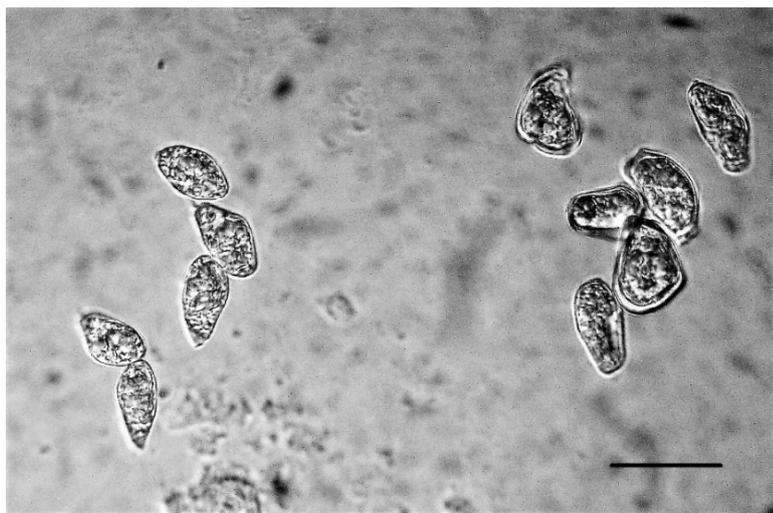


Рисунок 3 – Урединиоспоры *Hyalopsora polypodii* первого (слева) и второго типа, шкала – 30 мкм (световая микроскопия)

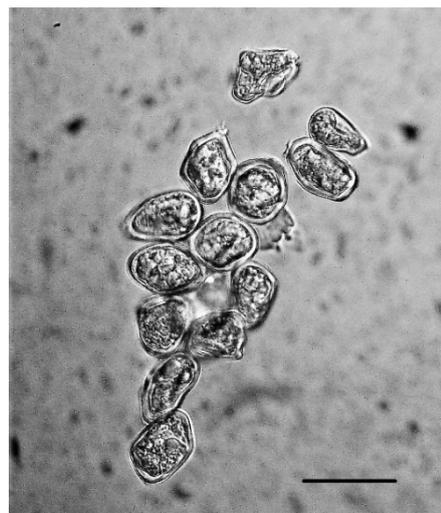


Рисунок 4 – Урединиоспоры *H. polypodii* второго типа, шкала – 30 мкм (световая микроскопия)

Телии гриба образуются на нижней стороне листовой пластинки и листовых черешках ветренника округлые, мелкие, темно-бурые, порошкие. Телиоспоры (Рис. 6) двуклетные, слегка продолговатые, (35,5-40,0 x 22,0-25,5) мкм, на вершине округлые, у перегородки слабо-перетянутые, оболочка коричнево-бурая, на вершине без утолщения, волнистая, складчатая или бородавчатая. Ножка бесцветная, короткая, слабая, легко обламывающаяся.

На территории Заилийского Алатау *Micro-
puccinia resecta* была обнаружена в телиостадии в следующих местообитаниях:

На *Anemonastrum protractum* (Ulbr.) Holub, Заилийский Алатау, ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон северо-западной экспозиции, еловый лес, т. 288, 2477 м над ур. моря, N43°03'47.0", E76°56'18.5", 01.09.2018, Е.В. Рахимова.

На представителях рода *Thesium* в Казахстане отмечено несколько видов ржавчинных грибов рода *Puccinia*, которые различаются по морфологическим признакам.

Puccinia thesii (Desv.) Chaillet образует эции на обеих сторонах листа ленца. Перидий чашевидный, с отогнутым, рассеченным краем. Стенки перидиальных клеток выглядят тонко исчерченными (Рис. 7, 8). Эциоспоры округлые или эллипсоидальные (Рис. 9), 15,5-20,0 мкм в диаметре, с тонкой бесцветной оболочкой, мелко-бородавчатые.

Урединии формируются на обеих сторонах листьев и стеблях, мелкие, округлые, бурые,

долго прикрытые эпидермой. Урединиоспоры округлые (Рис. 10), 25,0-30,0 мкм в диаметре, оболочка толстая, светло-желто-бурая, до 3 мкм, с мелкими, редкими бородавочками. Телии черно-бурые, плотные, вначале прикрытые эпидермой, затем обнаженные. Телиоспоры двуклетные, эллипсоидальные или булавовидные (Рис. 11), (40,5-60,0 x 22,5-26,5) мкм, на вершине закругленные, у перегородки слабо-перетянутые, оболочка гладкая, на вершине утолщенная до 8 мкм, ножка прочная, желтоватая, толстая, не обрывающаяся.

На территории Заилийского Алатау *Puccinia thesii* была обнаружена в эцио-, урединио- и телиостадии в следующих местообитаниях:

На *Thesium alatavicum* Kar. & Kir., Заилийский Алатау, Малое Алматинское ущелье, ельники по северо-восточному склону р. Казачки, на высоте 2300 м над ур. моря, 20.06.1945, М.Н. Кузнецова; там же, ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон северной экспозиции, еловый лес, т. 300, 2365 м над ур. моря, N43°04'10.1", E76°59'25.3", 07.09.2018, Л.А. Кызметова.

Из сопредельных территорий гриб был отмечен в Турции, на *Thesium ramosum* Hayne, *T. compressum* Boiss. & Heldr., *T. macranthum* Fenzl., *T. procumbens* C.A. Mey., *T. stelleroides* Jaub. & Spach, *T. tauricum* Boiss. & Hausskn. [10], и в поясе лесов и высокотравных лугов Ат-Башинского хребта Кыргызстана (растение-хозяин не указан) [21], в Иране [22] и в Российской Федерации на различных видах *Thesium* [5]. Гриб зарегистрирован также на *Thesium ramosum* на

территории Бахчисарайского района Горного Крыма (гора-останец Шелудивая) [23] и на *Thesium linophyllum* в Польше [24].

Телиостадия гриба *Puccinia mougeotii* Lagerh. была зарегистрирована ранее в Казахстане только на *Thesium refractum* С.А. Меу. (Семипала-

тинск, северные склоны г. Альджан, 20.05.1914, Шипчинский). *Puccinia mougeotii* также отмечена на *Thesium alatavicum* в Кыргызстане (Терской Алатау) [13] и на *Thesium alpinum* в Польше (Татры) [5, 25], указано, что гриб является редким.

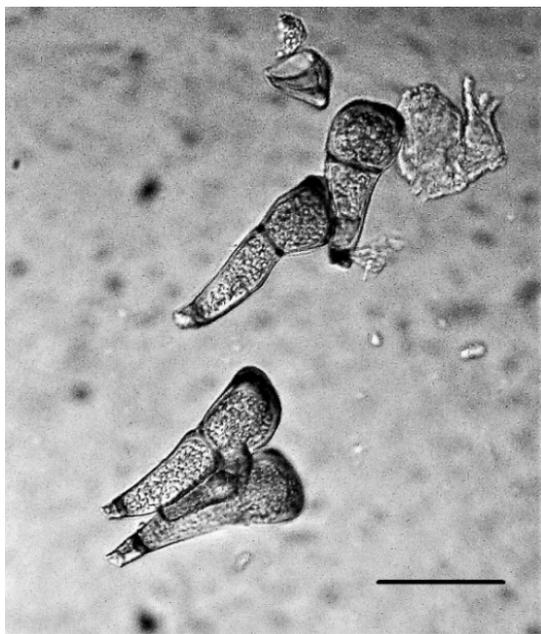


Рисунок 5 – Телиоспоры *Puccinia atragenicola*, шкала – 40 мкм (световая микроскопия)

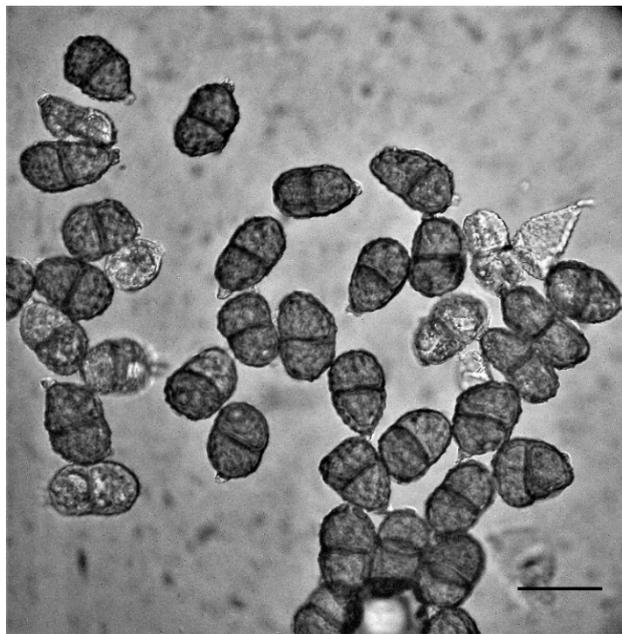


Рисунок 6 – Телиоспоры *Micropuccinia retecta*, шкала – 40 мкм (световая микроскопия)

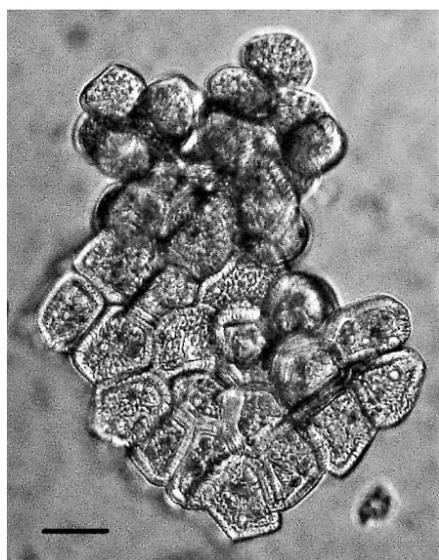


Рисунок 7 – Клетки перидия *Puccinia thesii*, шкала 20 мкм (световая микроскопия)

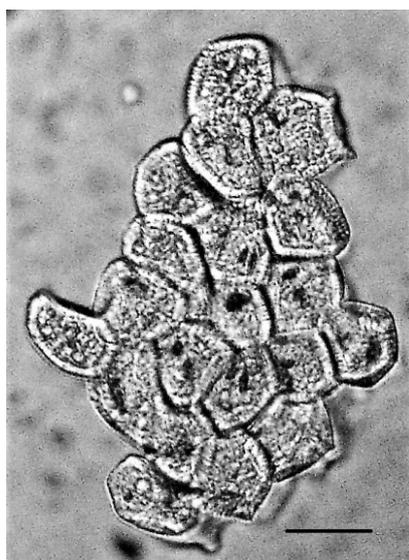


Рисунок 8 – Клетки внутреннего перидия *P. thesii*, шкала 30 мкм (световая микроскопия)

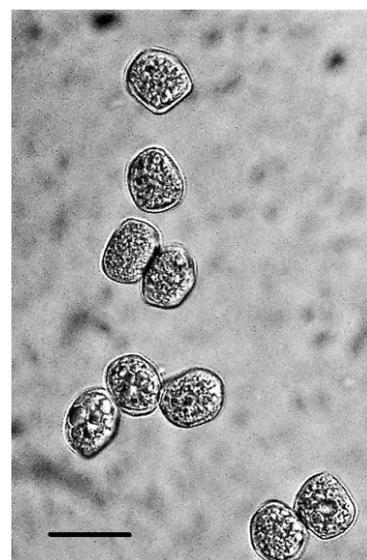


Рисунок 9 – Эциоспоры *P. thesii*, шкала 25 мкм (световая микроскопия)

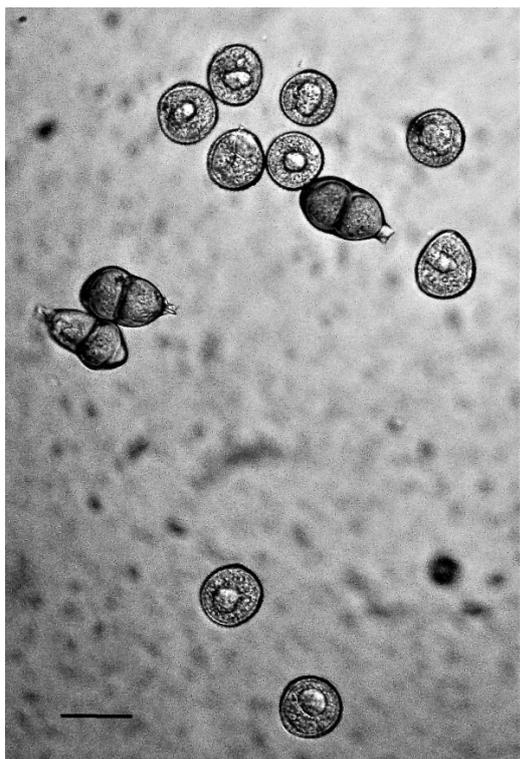


Рисунок 10 – Урeдиниоспоры *P. thesii*, шкала 30 мкм (световая микроскопия)

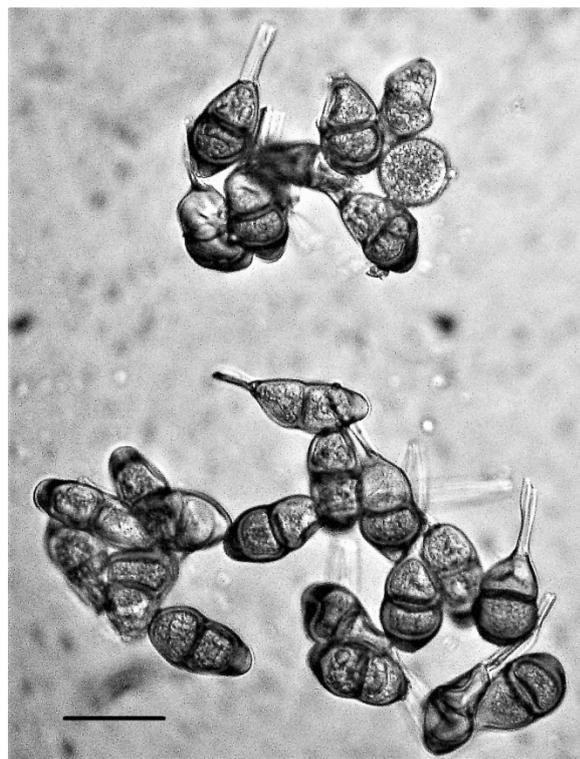


Рисунок 11 – Телиоспоры *P. thesii*, шкала 50 мкм (световая микроскопия)

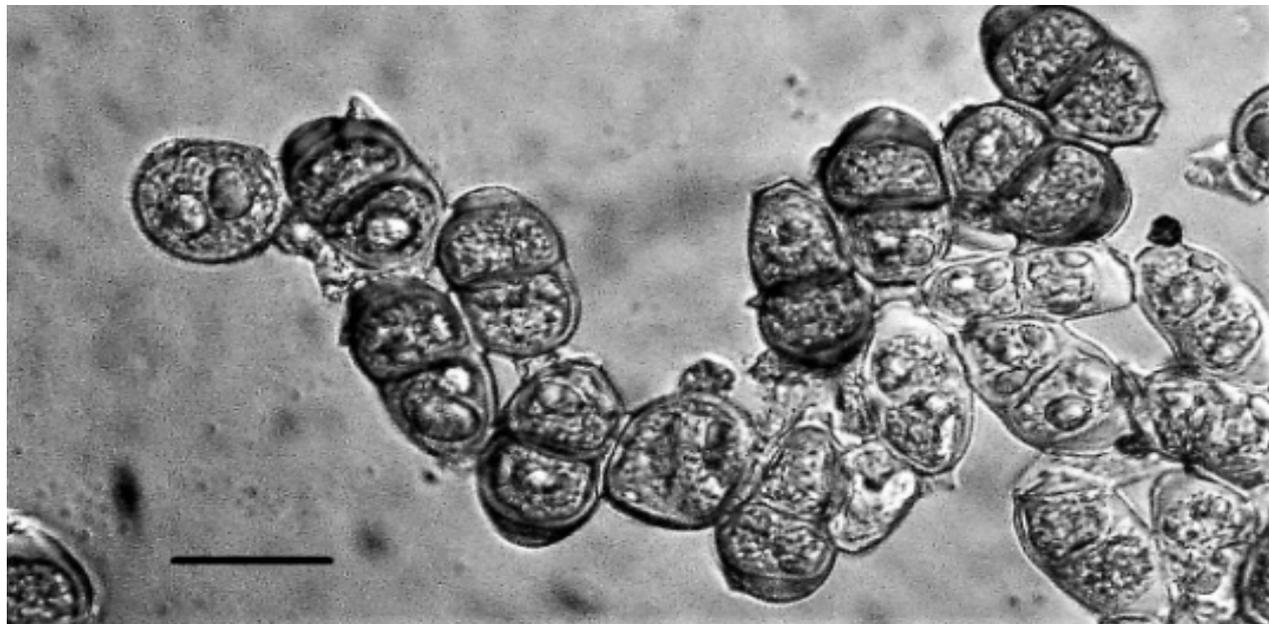


Рисунок 12 – Урeдинио и телиоспоры *Puccinia mougeotii*, шкала 25 мкм (световая микроскопия)

Беспорядочно расположенные эции формируются на нижней стороне листа ленца или на стеблях; перидий блюдцевидный, с прямостоя-

чим краем. Эциоспоры сферические, до 18 мкм в диаметре, иногда слегка угловатые, или многогранные. Оболочка тонкая, мелко бородавчатая.

Округлые, рассеянные, бурые, порошащиеся урединии образуются там же, где и эции. Урединиоспоры округлые (19,0-22,5 мкм в диаметре), реже коротко эллипсоидальные (Рис. 12); оболочка около 2 мкм толщины, светложелтобурая, усаженная шиповидными бородавочками, неравномерно расположенными по поверхности. Телии округлые или продолговатые, иногда взаимно сливающиеся, долго прикрыты серым блестящим эпидермисом, чернобурые, порошащиеся. Форма телиоспор варьирует от эллипсоидных, (30,5-41,5×19,5-21,0) мкм, до косо вытянутых или слегка суженных (Рис. 12). Верхушка телиоспор закругленная; у перегородки они слабо перетянуты, книзу сужены, к ножке закругленные, нижняя клетка спор часто длиннее и уже верхней; оболочка желтовато-бурая; ножка бесцветная или светло-желтоватая, легко обрывающаяся.

На территории Заилийского Алатау *Puccinia mougeotii* была обнаружена в телиостадии в следующих местообитаниях:

На *Thesium alatavicum* Kar. & Kir., Заилийский Алатау, ИАГНПП, Большое Алматинское ущ., склон северной экспозиции, еловый лес, т. 302, 2395 м над ур. моря, N43°04'06.4", E76°59'26.9", 10.09.2018, Е.В. Рахимова; там же, склон западной экспозиции, еловый лес, т. 296, 2537 м над ур. моря, N43°03'32.7", E76°59'17.1", 04.09.2018, А.М. Асылбек.

Заключение

Целью работы было выявление малоизвестных видов ржавчинных грибов на территории Иле-Алатауского национального парка,

описание их биологии и местонахождений, установление круга растений хозяев. Материалом для статьи служили собственные сборы авторов из района исследований. Препараты готовили по стандартной методике, изучали и фотографировали с помощью фотомикроскопа Polyvar с интерференционной оптикой Номарского.

Описаны 7 малоизвестных видов ржавчинных грибов Заилийского Алатау: *Pucciniastrum pyrolae* на *Pyrola rotundifolia* и *Moneses uniflora*; *P. goodyerae* на *Goodyera repens*; *Hyalopora polypodii* на *Cystopteris fragilis*; *Puccinia atragenicola* на *Atragene sibirica*; *Micropuccinia resecta* на *Anemonastrum protractum*; *Puccinia thesii* на *Thesium alatavicum*; *P. mougeotii* на *Thesium alatavicum*. Из всех изученных видов только *Puccinia atragenicola*, *Micropuccinia resecta* и *Puccinia mougeotii* являются редкими, причем вид *P. mougeotii* редок и в других регионах. Остальные виды встречаются достаточно часто, но в связи с мелкими размерами растений хозяев или в связи со своеобразными местообитаниями растения хозяина (под камнями), редко собираются при микологическом обследовании. Полученные данные расширяют сведения о местонахождениях малоизвестных ржавчинных грибов в Иле-Алатауском национальном природном парке.

Работа была выполнена в рамках научно-целевой программы BR05236546 «Реализация Государственными ботаническими садами приоритетных для Казахстана научно-практических задач Глобальной стратегии сохранения растений как устойчивой системы поддержания биоразнообразия», 2018-2020 гг.

Литература

- 1 Иващенко А.А. Материалы к флоре Иле-Алатауского национального парка и прилегающих территорий // Тр. Иле-Алатауского национального парка. Вып. 1. – Астана: Жасыл Орда, 2015. – С. 29-71.
- 2 Неводовский Г.С. Флора споровых растений Казахстана. – Том 1. Ржавчинные грибы. – Алма-Ата: Издательство АН КазССР, 1956. – 432 с.
- 3 Калымбетов Б.К. Микологическая флора Заилийского Алатау (Северный Тянь-Шань). – Алма-Ата: Наука, 1969. – 470 с.
- 4 Методические указания к занятиям спецпрактикума по разделу «Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов» для студентов 4 курса дневного отделения // Составители В.Д. Поликсенова, А.К. Храмов, С.Г. Пискун. – Минск: БГУ, 2004. – 36 с.
- 5 Траншель В.Г. Обзор ржавчинных грибов СССР – Москва, Ленинград: Издательство АН СССР, 1939. – 426 с.
- 6 База данных Index Fungorum. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp/> (дата обращения: 25.10.2018).
- 7 Плантариум, определитель растений on-line [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.plantarium.ru (дата обращения: 25.10.2018).
- 8 Нам Г.А., Рахимова Е.В., Ермакова Б.Д., Абиев С.А., Есенгулова Б.Ж., Кызметова Л.А. Грибы Казахского Алтая (конспект видов). – Алматы: «Интеллект», 2011. – 298 с.

- 9 Рахимова Е.В., Ермакова Б.Д., Асылбек А.М., Есенгулова Б.Ж. Редко встречающиеся и малоизвестные виды микромицетов Казахского Алтая // Мат-лы IV международной конференции «Биоразнообразие, проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее». – Горно-Алтайск, 2016. – С. 224-227.
- 10 Bahcecioglu Z., Kabakere S. Checklist of rust fungi in Turkey // Mycotaxon. – 2012, Vol. 119. – P. 493-494(2).
- 11 Kaneko S. Parasitic fungi on woody plants from Pakistan // Cryptogamic flora of Pakistan. Vol. 2. (Eds.: T. Nakaike and S. Malik). – Tokyo, 1993. – P. 149-168.
- 12 Домашова А.А. Микофлора хребта Терской Ала-Тоо Киргизской ССР. – Фрунзе, 1960. – 242 с.
- 13 Корбонская Я.И. Определитель ржавчинных грибов Средней Азии и Южного Казахстана. – Душанбе, 1969. – 220 с.
- 14 McGinnis M.R. Selected aspects of the biology of *Hyalospora polypodi* on *Cystopteris fragilis* // Mycologia. – 1971, Vol. 63. – P. 277-282.
- 15 Рамазанова С.С., Файзиева Ф.Х., Сагдуллаева М.Ш., Киргизбаева Х.М., Гапоненко Н.И. Флора грибов Узбекистана. Том 3. Ржавчинные грибы. – Ташкент: Фан, 1986. – 232 с.
- 16 Мосолова С.Н. Поражаемость грибами растений бассейна реки Чон-Курчак // Известия ВУЗов (Кыргызстан). – 2015, №1. – С. 80-87.
- 17 Мосолова С.Н. Видовой состав микромицетов бассейна реки Чон-Курчак // Наука и новые технологии. – 2015, №2. – С. 106-112.
- 18 Zhuang J. A taxonomic revision of the Chinese species of *Puccinia* on the plants belonging to Ranales // Mycosystema. 1991, Vol. 4. – P. 73-86.
- 19 Бексултанова А.М. Анализ микромицетов Джумгалского района // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Вятка, 5-8 декабря 2016). – Киров: Радуга-Пресс, 2016. – С. 354-357.
- 20 Бексултанова А.М. Поражаемость микромицетами растений бассейна реки Джумгал // Известия ВУЗов Кыргызстана. – 2017, №11. – С. 84-86.
- 21 Мамбетказиева А.М. Распределение микромицетов по растительным поясам Ат-Башинской долины и северного склона Ат-Башинского хребта // Вестник современной науки. – 2016, №10-1 (22). – С. 26-30.
- 22 Abbasi M. First report of *Puccinia thesii* on *Thesium arvense* // Rostaniha. – 2006, Vol. 7. – №1. – P. 75-76, 101-103.
- 23 Просянникова И.Б., Пирогова С.А., Кравчук Е.А. Фитотрофные паразитические микромицеты регионального памятника природы «гора-останец Шелудивая» Бахчисарайского района (республика Крым) // Экосистемы. – 2017, №9 (39). – С. 12-19.
- 24 Sucharzewska E, Marczakiewicz M, Ejdyś E. *Puccinia passerinii* (Pucciniales) on *Thesium ebracteatum* in the Biebrza National Park – new data on its distribution in Central Europe // Acta Mycol. – 2016, Vol 51(2). – P. 1083-1090.
- 25 Majewski T. Podstawczaki (Basidiomycetes), rdzawnikowe (Uredinales) II. In: Flora Polska. Grzyby (Mycota). (Eds.: Kochman J., Skirgiełło A.), 11. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 1979. – P. 149-168.

References

- 1 Abbasi M. (2006) First report of *Puccinia thesii* on *Thesium arvense*. Rostaniha, vol. 7, no 1, pp. 75-76, 101-103.
- 2 Bahcecioglu Z., Kabakere S. (2012) Checklist of rust fungi in Turkey. Mycotaxon, vol. 119, pp. 493-494 (2).
- 3 Beksultanova A.M. (2016) Analis mikromizetov Dzhumgalskogo raiona [Analysis of micromycetes of the dzhumgalsky district]. Biodiagnostics of the state of natural and man-made systems: proceedings of the XIV all-Russian scientific and practical conference with international participation (Vyatka, December 5-8, 2016). – Kirov: Raduga-Press, pp. 354-357.
- 4 Beksultanova A.M. (2017) Porazhaemost mikromizetami rastenii basseina reki Dzhumgal [Incidence of micromycetes of plants in the basin of the river Jumgal]. News of HEI (Kyrgyzstan), no 11, pp. 84-86.
- 5 Data base Index Fungorum. [Electronic resource] Access mode: <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp/> (date of appeal: 25.10.2018).
- 6 Domashova A.A. (1960) Mikoflora khrebta Terskei Ala-Too Kirgizskoi SSR [Mycoflora of the ridge of the Terskei Ala-Too in Kyrgyz SSR]. Frunze, 242 p.
- 7 Ivashchenko A.A. (2015) Materialy k flore Ile-Alatauskogo nazionalnogo parka i prilegayushchikh territorii [Materials for the flora of the Ile-Alatau national Park and surrounding areas]. Proceedings of the Ile-Alatau national Park. Vol. 1. – Astana: Zhasyl Orda, 2015. – pp. 29-71.
- 8 Kalymbetov B.K. (1969) Mikologicheskaya flora Zailiiskogo Alatau (Severnyi Tian-Shan) [The Mycological flora of the Trans-Ili Alatau (Northern Tien Shan)]. Alma-Ata: Nauka, 470 p.
- 9 Kaneko S. (1993) Parasitic fungi on woody plants from Pakistan. Cryptogamic flora of Pakistan, vol. 2. (Eds.: T.Nakaike and S. Malik), 1993, pp. 149-168.
- 10 Korbonovskaya Y.I. (1969) Opredelitel rzhavchinnnykh gribiv Srednei Asii i Kazakhstana [The determinant of rust fungi in Central Asia and southern Kazakhstan]. Dushanbe, 220 p.
- 11 Majewski T. (1979) Podstawczaki (Basidiomycetes), rdzawnikowe (Uredinales) II. In: Flora Polska. Grzyby (Mycota). (Eds.: Kochman J., Skirgiełło A.), 11. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe, pp. 149-168.
- 12 Mambetkazieva A.M. (2016) Raspredelenie mikromizetov po rastitelnykh poyasam At-Bashinskoi doliny i severnogo sklona At-Bashinskogo khrebta [Distribution of micromycetes on plant zones of the At-Bashy valley and the Northern slope of the At-Bashy mountain range]. Bulletin of modern science, no 10-1 (22), pp. 26-30.

- 13 McGinnis M.R. (1971) Selected aspects of the biology of *Hyalopsora polypodii* on *Cystopteris fragilis*. *Mycologia*, vol. 63, pp. 277-282.
- 14 Metodicheskie ukazania k zanyatiyam spezhpraktikumuma po razdelu "Mikilogia. Metody eksperimentalnogo izucheniya mikroskopicheskikh gribov" dla studentov 4 kursa dnevnogo otdeleniya [Methodical instructions to occupations of a special practicum on the section "Mycology. Methods of experimental study of microscopic fungi" for students of the 4th course of the day Department]. Compilers of V.D. Poliksenova, A.K. Khramtsov, S.G. Piskun, Minsk: BSU, 2004, 36 p.
- 15 Mosolova S.N. (2015) Porazhaemost gribami rastenii basseina reki Chon-Kurchak [The incidence of fungi to plants of the basin of the river Chon-Kurchak]. *News of HEI (Kyrgyzstan)*, no 1, pp. 80-87.
- 16 Mosolova S.N. (2015) Vidovoi sostav mikromizetov basseina reki Chon-Kurchak [Species composition of micromycetes of the Chon-Kurchak river basin]. *Science and new technologies*, no 2, pp. 106-112.
- 17 Nam G.A., Rakhimova Y.V., Yermekova, B.D., Abiyev S.A., Yessengulova B.Z., Kyzmetova L.A. (2011) Griby Kazakhstanskogo Altaya (konspekt vidov) [Fungi of the Kazakhstan Altai (synopsis of species)]. – Almaty: "Intellect", 298 p.
- 18 Nevodovskii G.S. (1956) Flora sporovykh rastenii Kazakhstana. Tom 1. Rzhavchinnye griby [Flora of spore plants in Kazakhstan. Vol. 1. Rust fungi.]. Alma-Ata: Publishing house of Kazakh SSR, 432 p.
- 19 Plantarium, the determinant of plants on-line [Electronic resource]. Access mode: www.plantarium.ru (date of appeal: 25.10.2018).
- 20 Prosyannikova I.B., Pirogova S.A., Kravchuk E.A. (2017) Fitotrofnye paraziticheskie mikromizety regionalnogo pamyatnika prirody "gora-ostanez Sheludivaya" Bakhchisaraiskogo raiona (respublika Krym) [Phytotrophic parasitic micromycetes of the regional nature monument "Gora-Butte Mangy" Bakhchisaraysky district (Republic of Crimea)]. *Ecosystem*, no 9 (39), pp. 12-19.
- 21 Rakhimova Y.V., Yermekova B.D., Assylbek A.M., Yessengulova B.Z. (2016) Redko vstrechayushiyesya i maloizvestnyye vidy mikromizetov Kazakhstanskogo Altaya [Rare and little-known species of micromycetes in the Kazakhstan's Altai]. *Materials of the IV international conference " Biodiversity, problems of ecology of the Altai Mountains and adjacent regions: present, past, future"*, Gorno-Altaysk, pp. 224-227.
- 22 Ramazanova S.S., Faiziyeva F.H., Sagdullayeva M.S., Kirgizbayeva H.M., Gaponenko N.I. (1986) Flora gribov Uzbekistana. Tom 3. Rzhavchinnye griby [Fungal flora of Uzbekistan. Vol. 3. Rust fungi]. – Tashkent: Fan, 232 p.
- 23 Sucharzewska E, Marczakiewicz M, Ejdyś E. (2016) *Puccinia passerinii* (Pucciniales) on *Thesium ebracteatum* in the Biebrza National Park – new data on its distribution in Central Europe. *Acta Mycol*, vol 51(2), pp. 1083-1090.
- 24 Transhel V.G. (1939) *Obzor rzhavchinnych gribov SSSR* [Review of rust mushrooms of the USSR]. -Moscow, Leningrad: Publishing house of the USSR Academy of Sciences, 426 p.
- 25 Zhuang J. (1991) A taxonomic revision of the Chinese species of *Puccinia* on the plants belonging to Ranales. *Mycosystema*, vol. 4, pp. 73-86.

2-бөлім
**ӨСІМДІКТЕР ФИЗИОЛОГИЯСЫ
МЕН БИОХИМИЯСЫ**

Section 2
**PLANTS PHYSIOLOGY
AND BIOCHEMISTRY**

Раздел 2
**ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ
РАСТЕНИЙ**

**Zhussupova A.I.¹, Zhangissina S.²,
Zhunusbaeva Zh.K.³, Omirbekova N.Zh.⁴**

¹e-mail: aizhan.zhussupova@kaznu.kz

²e-mail: saule.zhangisina@gmail.com

³e-mail: zhazira.zhunusbaeva@kaznu.kz

⁴e-mail: nargul.omirbekova@kaznu.kz

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan,

COMPARATIVE STUDY OF *BRACHYPODIUM DISTACHYON* AND KAZAKHSTAN SOFT WHEAT VARIETIES RESISTANCE TO *Puccinia recondita*

One of the important issues of the modern world economics is ensuring the quality of food, relevant for Kazakhstan, where the possibility of cultivating soft and hard wheat varieties and high technological quality grain production are among the strategically important tasks of its national security. Biotic and abiotic environmental stress factors may lead to decrease in cereals productivity, and annual loss in the global yield of crops from diseases, according to FAO, is estimated at more than \$25 billion, equivalent to 35% of the potential harvest. At the same time, creation of pathogen-resistant varieties of cultivated plants by means of traditional breeding is long-term, and the evolution of pathogens is ahead of the possibilities of practical breeding, resulting in creation of pathogen resistant varieties being late with their introduction into production; for a deeper understanding of the basics and in terms of accelerating processes in the leading countries of the world, model organisms are involved into the process. The aim of this work is to estimate the influence of brown leaf rust on the elements of productivity and protein content in grain of local varieties of soft wheat Kazakhstanskaya 19, Kazakhstanskaya early and new model object *Brachypodium distachyon* along with their correlation. The results of the comparative study of the impact of biotic stress on the elements of productivity have shown that *Puccinia recondita* statistically significantly reduces the productivity of all parameters in wheat varieties Kazakhstanskaya 19, Kazakhstanskaya early and model object *Brachypodium distachyon*. The protein content in the grain of wheat of local breeding varieties Kazakhstanskaya 19, Kazakhstanskaya early and wild cereal *Brachypodium distachyon* is not changed when infected with brown leaf rust.

Key words: *Brachypodium distachyon*, Kazakhstani soft wheat varieties, brown leaf rust, resistance, study.

Жусупова А.И.¹, Жангисина С.К.²,
Жунусбаева Ж.К.³, Омирбекова Н.Ж.⁴

¹e-mail: aizhan.zhussupova@kaznu.kz

²e-mail: saule.zhangisina@gmail.com

³e-mail: zhazira.zhunusbaeva@kaznu.kz

⁴e-mail: nargul.omirbekova@kaznu.kz

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

***Brachypodium distachyon* және қазақстандық селекциясының жұмсақ бидай сорттарының *Puccinia recondita*-ға салыстырмалы зерттеу**

Қазіргі заманғы әлемдік экономиканың маңызды мәселелерінің бірі – азық-түлік өнімдерінің сапалы болуын қамтамасыз ету; жұмсақ және қатты бидай сорттарын өсіру мүмкіндігі және жоғары технологиялық, сапалы дән өндіру – ұлттық қауіпсіздікті қамтамасыз етудің стратегиялық маңызы бар міндеттерінің қатарына жатады. Биотикалық және абиотикалық экологиялық стрестік факторлар астықтық дақылдардың өнімділігінің төмендеуіне алып келуі

мүмкін. Әлемдік азық-түлік және ауыл шаруашылық ұйымының мәліметтері бойынша, әлемде жыл сайынғы дақылдардың әртүрлі аурулардан жоғалтатын өнімі 25 миллиард долларға бағаланады, бұл алынуы мүмкін өнімнің 35%-на парапар. Мәдени өсімдіктердің патогендердің әсеріне төзімді сорттарын дәстүрлі селекция әдістерімен шығару өте ұзақ процесс болып табылады. Патогендердің эволюциясы практикадағы селекцияның мүмкіндіктерінен әлдеқайда ілгері жүреді, соның салдарынан өсімдіктердің патогендердің әсеріне төзімді сорттарын шығару, олардың өндіріске енгізілуінен кешеуілдеп қалады. Мәселеннің төркінін тереңірек түсіну үшін және селекция процесін жеделдету үшін әлемнің алдыңғы қатарлы елдерінде модельдік организмдер қолданылады. Берілген еңбектің мақсаты – *Brachypodium distachyon* өсімдігінің және жұмсақ бидайдың қазақстандық сорттарының *Puccinia recondita*-ның әсеріне төзімділігін салыстырмалы түрде зерттеу. Биотикалық стресстің өнімділік элементтеріне әсерін салыстырмалы талдау нәтижелері *Puccinia recondita* Қазақстанская 19, Қазақстанская раннеспелая сорттарының және модельдік объект *Brachypodium distachyon* өсімдігінің барлық өнімділік көрсеткіштерін статистикалық сенімді деңгейде төмендететінін көрсетті. Жергілікті селекция нәтижесінде шығарылған Қазақстанская 19, Қазақстанская раннеспелая және жабайы астық тұқымдас *Brachypodium distachyon* өсімдігін қоңыр жапырақ татымен жұқтырғанда өсімдіктердің дәндеріндегі нәруыз мөлшері өзгермейді.

Түйін сөздер: *Brachypodium distachyon*, жұмсақ бидайдың қазақстандық селекциясының сорттары, қоңыр жапырақ таты, төзімділік, зерттеу.

Жусупова А.И.¹, Жангисина С.К.²,
Жунусбаева Ж.К.³, Омирбекова Н.Ж.⁴

¹e-mail: aizhan.zhussupova@kaznu.kz

²e-mail: saule.zhangisina@gmail.com

³e-mail: zhazira.zhunusbayeva@kaznu.kz

⁴e-mail: nargul.omirbekova@kaznu.kz

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

Сравнительное изучение устойчивости *Brachypodium distachyon* и казахстанских сортов мягкой пшеницы к *Puccinia recondita*

Одними из важных проблем современной мировой экономики являются обеспечение качества продуктов питания; возможность культивирования сортов мягкой и твердой пшеницы и высокотехнологичного качественного производства зерна, это также относится к стратегически важным задачам обеспечения национальной безопасности. Биотические и абиотические экологические стрессовые факторы могут привести к снижению продуктивности зерновых культур, а ежегодная мировая потеря урожайности культур от болезней, по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации, оценивается более чем в 25 миллиардов долларов, что эквивалентно 35% потенциального урожая. Создание патогенно-устойчивых сортов культурных растений посредством традиционной селекции является длительным процессом, а эволюция патогенов опережает возможность практической селекции, из-за чего производство устойчивых к патогенам сортов опаздывает по сравнению с их внедрением в производство; для более глубокого понимания основ и с целью ускорения селекционного процесса в ведущих странах мира привлекаются модельные организмы. Цель данной работы – сравнительное изучение устойчивости *Brachypodium distachyon* и казахстанских сортов мягкой пшеницы к *Puccinia recondita*. Результаты сравнительного анализа влияния биотического стресса на элементы продуктивности показали, что *Puccinia recondita* статистически достоверно снижает все показатели продуктивности у сортов пшеницы Қазақстанская 19, Қазақстанская раннеспелая и модельного объекта *Brachypodium distachyon*. Содержание белка в зерне мягкой пшеницы местной селекции Қазақстанская 19, Қазақстанская раннеспелая и дикого злака *Brachypodium distachyon* при инфицировании бурой листовой ржавчиной не изменяется.

Ключевые слова: *Brachypodium distachyon*, сорта мягкой пшеницы казахстанской селекции, бурая листовая ржавчина, устойчивость, исследование.

Introduction

From the ancient times, humanity has been growing cereals, with wheat, corn, and rice currently being able to provide nearly two thirds of the global caloric intake [1]. Under current conditions

of growing shortage of wheat, humanity might once again face an acute problem of the food crisis. Annual production of wheat on average is about 600 million tons. It is expected that by 2020 the demand for it may reach more than 840 million tons. Satisfying this need is a rather difficult task, taking into

account the fact that the number of cultivating areas decreases, and wheat yields in most developed countries have already reached the maximum level, for example, in Europe, this number reaches more than 8 tons per hectare [2].

At the same time, creation of pathogen-resistant varieties of cultivated plants by means of traditional breeding is long-term, and the evolution of pathogens is ahead of the possibilities of practical breeding, because of which production of pathogen resistant varieties is late with their introduction into production. Study on attributes of plant immunity, especially in chosen based on their suitability for research model plants facilitates understanding the mechanisms of plant resistance and improving disease management strategies [3; 4]. Production of high-quality grain in Kazakhstan is an important strategic direction, contributing to stabilization of agriculture, food security of the country and a decent position in the club of grain exporters in the world market [2].

Puccinia recondita Rob. ex Desm f. sp. tritici or wheat brown leaf rust is one of the most common and harmful types of rusts and despite the fact that its harmfulness is somewhat lower than that of stripe and yellow rusts, the loss of grain from this disease for a number of losses over a number of years might be higher than from the other rusts during the same period of time with epiphytotic diseases occurring in Kazakhstan with a frequency of 2-3 times in 10 years with the loss of yield up to 30-50% [5-7]. Losses of the world harvest, only from the brown rust are estimated in the equivalent of \$2 billion [8; 9]. The harmfulness of brown rust is manifested in a decrease in plant assimilation, enhancement of transpiration, respiration and biochemical processes, with a complete disturbance of the water balance, causing premature death of the leaves. The disease inhibits synthesis and deposition of starch, as well as protein in the endosperm, resulting in the formation of a frail grain. With severe damage to plants, fewer grains are formed in the ears, they are of poor quality and with a reduced protein content. The shortage of the harvest depends on the pathogenicity of the pathogen, crop resistance, weather conditions and other [7].

Creation of pathogen-resistant varieties of cultivated plants by methods of traditional breeding is long-term, and the evolution of pathogens is ahead of the possibilities of practical breeding, resulting in creation of varieties resistant to pathogens being late with their introduction into the production cycle [10]. An important mean of control is breeding of wheat with application of new, non-traditional

techniques, combining the efforts of classical breeders, geneticists, biochemists, physiologists, immunologists and biotechnologists, as only the complex approach may increase the breeding performance. This trend implies, first, identifying the biological signs that provide the best possible adaptation to the natural conditions of the arid zone in order to obtain initial material for breeding of new productive varieties [11].

On the south-eastern part of Kazakhstan primary staple culture is soft wheat, which is currently infested by the brown rust. *Brachypodium (B.) distachyon* is the only annual wild grass, phylogenetically closely related to the most important cereal crops – wheat, barley, rice, has a number of advantages (a relatively small size of genome, consisting of five chromosomes with a capacity of 272 million base pairs, 15-20 cm in height, ease of cultivation in the laboratory conditions), which makes it a convenient object for fundamental and innovative applied research in the field of cell biology, biochemistry, molecular genetics and agricultural biotechnology; leading scientists from all over the world contributed to the development of its resources and research tools, in particular, the BrachyTAG project with the basic goal of identifying key genes involved in its development, reproduction, bioenergetics, adaptation to environmental factors, including the study of the resistance of cultural grasses to the most harmful and common diseases (rust, septoriosi, fusariosis) [3; 12; 13].

Earlier in a number of works, it was shown that brown rust could infect *B. distachyon*: the formation of pustules, necrotic spots, and indicative of the hypersensitivity response of plant to the action of the pathogen [5]. However, the detailed study of the mechanisms underlying the nonhost resistance in the model object *B. distachyon* to the action of brown rust never performed earlier.

Our scientific group is the first in Kazakhstan, engaged in detailed studies on the use of *B. distachyon* as a model object for studying changes caused by the brown rust pathogen. In the process of completion the research work on the project “Introduction of a new model object *Brachypodium distachyon* L. into the breeding practice in order to improve the resistance of cereals to biotic environmental factors” (SR No. 0115RK00382), work continued in “Physiological and biochemical mechanisms of nonhost resistance of the model object *Brachypodium distachyon* L. to brown leaf rust”. Within the framework of the project the influence of *P. recondita* on the activity of a number of stress enzymes in *B. distachyon* (standard resistant line Bd21) and soft wheat (two

varieties with different degrees of resistance – Kaz. (Kazakhstanskaya) early and Kaz. 19) prior and upon the pathogen infection, the composition of the storage proteins in the endosperm of *Bd* and soft wheat were estimated among the rest. Some results of this study are presented in the current paper.

Materials and methods

Seeds of *B. distachyon* L. (Bd21 line) were obtained from the RIKEN BioResource Center (Tsukuba City, Ibaraki, Japan). Wheat varieties were picked on their degree of resistance and susceptibility to *P. recondita*. According to the assessment of Kazakh SRI for Arable Farming and Plant Growing (Almalybak, Almaty region, Kazakhstan) and SRI of Biological Security Issues, MES RK (Gvardeyskiy, Zhambyl region, Kazakhstan) Kaz. 19 variety possesses a resistance to the brown rust (15%), and Kaz. early variety is affected up to 40%. According to the laboratory assessment of the quality of grain by RK state commission for variety testing both varieties meet the requirements of the state standard No.1046-2008 14-day old seedlings of *B. distachyon* and chosen wheat varieties served the material of

the study. Prior to growing seeds were soaked for 5 minutes in a weak solution of potassium permanganate at a temperature of 25°C. Treated seeds were washed for 5 minutes in running water, then for 5 minutes three times with sterile water. Seeds were placed in plastic Petri dishes and germinated for 48 hours in a thermostat at a temperature of 25°C. After 48 hours, sprouts were germinated at room temperature at the light. In the process of germination sprouts were watered with chilled boiled water (Figure 1).

Sowing of wheat seeds on plots 1 m wide with a row spacing of 15 cm was carried out annually by hand. 20 seeds of wheat were planted in each row and 12 seeds of Bd21. Seeds were sown every year in the same calendar periods as the control group in order to analyze plants resistance to the leaf brown rust. Bd21 seeds germination was 94%, while wheat seeds one – 97-98%. In the two leaves growth phase, the plants of the experimental variant were inoculated with urediniospores, while control consisted of untreated plants. Kazakhstani population of fungus spores *P. recondita* provided by the SRI of Biological Security Issues, MES RK (Gvardeyskiy, Zhambyl region, Kazakhstan).

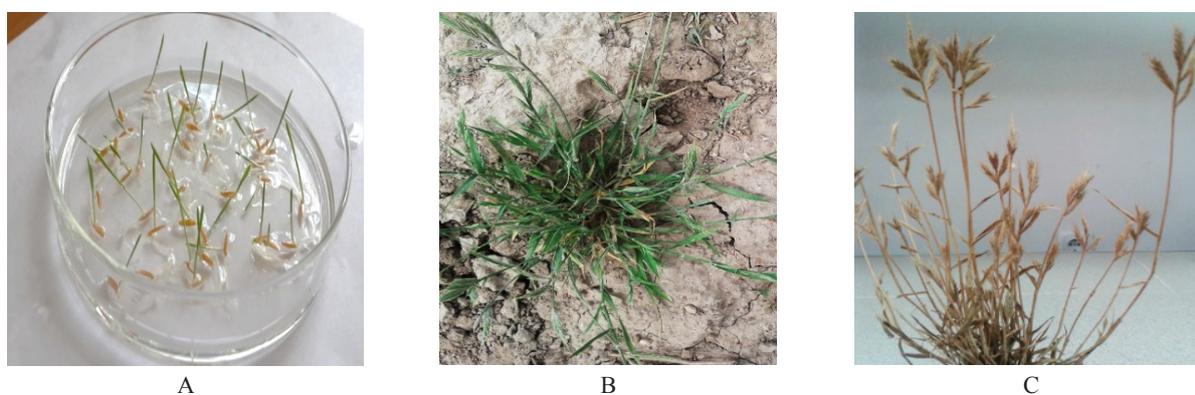


Figure 1 – Growth and development of the model system *Brachypodium distachyon*.

Note: A – in the laboratory; B – in the field; C – plant material for the morphometric analysis

P. recondita infection of the plants of the experimental sample was carried out in the tillering phase, by inoculation with urediniospores (Figure 2). Inoculum has been activated during 30 min at a temperature of 37-40°C, and it has been watered in a wet chamber during 4 hours. The plants were sprayed with an aqueous suspension of *P. recondita* spores which contented 0.001% of Twin-80, contagion pathogen load was 20 mg/m². Plants treatment was carried out after pre-moisturizing in the evening time and high humidity

conditions were constructed (by covering with polyethylene film). There were untreated plants in the control. Infection symptoms were registered in 7-9 days. Sustainability to the brown rust of wheat and Bd21 were screened in the field conditions. Immunological analysis was performed according to R.A. McIntosh, where there are 5 types of reaction such as 0 is immune, damage is not observed; R is resistant, the plant ability to resist pathogen action; MR is moderately stable; MS is moderately susceptible; S is susceptible [14].

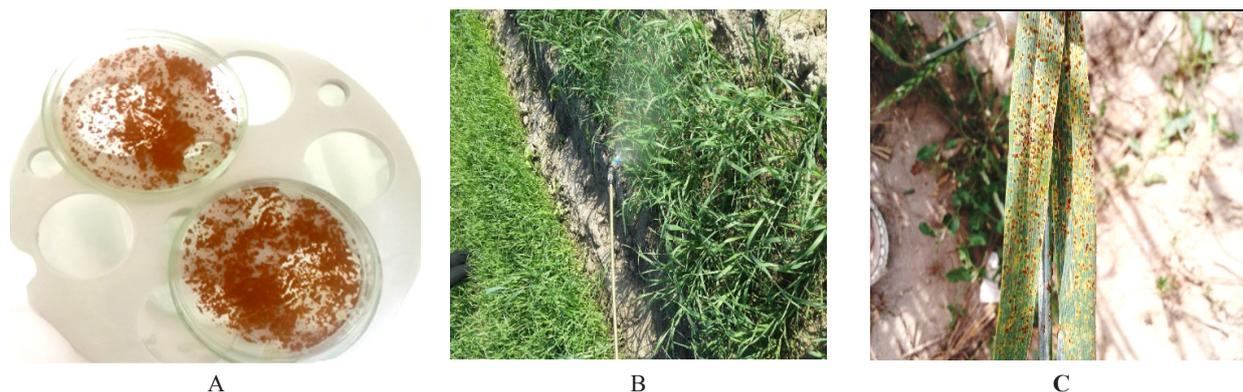


Figure 2 – *Puccinia recondita* spores preparation to the germination and infection the plants in a field condition.
Note: A – spores germination; B – treatment; C – pustules on plants

The identification of morphometric features was carried out in accordance with I. Ermakov conventional methods (2007).

The analysis of the contamination by *P. recondita* spores was carried out on from 8th to 11th days after inoculation according to generally accepted procedure [6].

A grain analyzer of protein and humidity based on the Near Infrared Spectroscopy (NIR) method, GrainAZX-50 portable grain analyzer, Zeltex (USA) was used to determine grain protein content in wheat and Bd21, automatic calibration of the instrument was carried out by software. 25 grains were assessed to determine the protein content of wheat, and 50 grains of *B. distachyon*. Protein content is % to dry weight of grain. The total protein content of the leaves (mg/ml) was estimated by a microbiuretic method using Benedict reagent at a wavelength of 330 nm [15; 16]. Estimation of free proline in leaves was carried out by L. Bates method (1973).

Extraction of the storage proteins of endosperm, gliadins, and glutenins. The glutenins were fractionated with a buffer solution (pH 6.8). Separation of glutenins in an alkaline condition was carried out according to U. Laemmli (1970), in acidic – according to Popereya (1989). High molecular weight glutenin subunits (HMGS) were identified by comparing the electrophoregrams of the analyzed sample with the spectrum of assay varieties according to the catalog. Gliadin extraction was performed with 70% ethanol. Electrophoresis was performed in polyacrylamide gel in glycine acetate buffer pH 3.1. Gels were fixed in 10% trichloroacetic acid, stained with 0.2% Coomassie R-250. Gliadin components were recorded by their electrophoretic mobility in the gel within α , β , γ and ω subfractions. Analysis of seed storage proteins was carried out in an alka-

line (sodium dodecyl sulphate electrophoresis) and acidic systems according to G. Galili (1983).

For estimation of superoxide dismutase (SOD), samples were placed on the gels in 20% glycerol and electrophoresis was performed at 80 to 120 V (two mA/tube) until the bromphenol blue marker dye had swept through most of the gel. Protein was stained by immersion of the gels in 0.2% amido black in 7% acetic acid for 1 hour followed by destaining in 7% acetic acid. SOD was localized by soaking the gels in 2.45×10^{-3} M nitro blue tetrazolium for 20 min, followed by an immersion, for 15 min, in a solution containing 0.028 M tetramethylethylenediamine, 2.8×10^{-5} M riboflavin, and 0.036 M potassium phosphate at pH 7.8. The gels were then placed in small dry test tubes and illuminated for 5 to 15 min. During illumination, the gels became uniformly blue except at positions containing superoxide dismutase. Illumination was discontinued, when maximum contrast between the achromatic zones and the general blue color had been achieved. The gels were then photographed [17].

For estimation of nitrogen metabolism enzymes (GDG) leaves (200 mg) were chilled for 1 hour and then crushed with 2 ml extraction medium, containing 0.2 M Tris-buffer (pH 8.0), 0.1 M KH₂PO₄ and 1mM mercaptoethanol in a chilled mortar. The homogenate was filtered. The filtrate was centrifuged at 4 °C at 3500 rpm/min for 20 min. The supernatant was used as the enzyme source. The reaction was initiated by adding the enzyme extract to 0.5 ml of incubation mixture at 30°C. The assay mixture in a total volume of 1.5 ml contained 10 ml of 0.2 M Tris-buffer (pH 8.0), 0.2 ml of 0.2 M 2-oxoglutarate, 0.1 ml of 50 mM NADH and 0.2 ml of 1.5 M NH₄Cl. After 4 min, the reaction was terminated by adding 0.5 ml of 2,4-dinitrophenyl-

hydrazine (01 per cent in 2 n HCl) to 0-5 ml of reaction mixture after which 0-5 ml of benzyl alcohol (solvent specific for 2-oxoglutarate) was added. The contents were mixed for 2 min, and were then centrifuged at low speed (1500 rpm/min⁻¹) to separate the aqueous and the alcoholic fractions, 0-5 ml of 10 per cent Na₂CO₃ was then added to the latter and was mixed thoroughly. At denned time intervals (5 min), 2.5 ml of 1 n NaOH solution was added to each sample. A red to orange-red color developed, the optical density of which was measured at 420 nm [18].

Statistic processing of the results was done by Excel and according to P. Rokickij (1973).

Results of research

Crop yield is the criterion for assessing the quality of a variety. It depends on various factors. The following indicators are important elements of the crop structure: the number of productive stems from the unit area, the length of the ear, the number of spikelets in the ear, the number of grains in the ear, the mass of grains from one ear and the mass of 1000 grains. The productivity of plants is determined by a different combination of quantitative characteristics, which in turn are the result of a complex interaction of the genotype and environmental conditions. The mass of 1000 grains in grams reflects the amount of substance contained in the grain, its density and size. It is also an indicator of the quality of seed ma-

terial taken into account in determining the seeding rate, largely determines its germination and viability [19].

The control over the yield formation gives a possibility to determine and compare the elements due to them the potential for productivity can be, to identify the critical stages in plants organogenesis during which reducing the elements of potential productivity passes, and to determine which elements of productivity are most stable under unfavorable conditions [20]. The analysis of morphogenesis contribution to productivity using the method of structural analysis of ripened plants according to the elements of shoot productivity is most promising because of its informative impact [21]. Spike productivity is a complex trait, which depends on the interaction of a number of features, such as length of shoot and ear, the number of spikelets in spike, number of grains per spike and thousand-grain weight [22].

We analyzed the features of crop formation in soft wheat and *B. distachyon* under the action of *P. recondita*. During the structural analysis, the indices of the productivity elements were estimated, which determine the main components of the crop: productive bushiness, plant height, length of the main spike, number of grains of the main spike, the mass of grain from the main spike and mass of 1000 grains. The results of the morphometric analysis revealed that the pathogen exerted an inhibitory effect on the parameters of the elements of productivity in wheat and *B. distachyon* (Table 1).

Table 1 – Effect of *Puccinia recondita* pathogen on productivity elements in spring wheat varieties Kazakhstanskaya 19 and Kazakhstanskaya early differing in rust tolerance and *B. distachyon*

Variant	Plant height, cm	Productive bushiness, number	Main spike			1000-grain weight, g
			Spike length, cm	Grain number	Grain weight, g	
Kaz. 19						
C	124.61±0.40	5.50±0.51	10.48±0.43	46.58±0.50	2.81±0.33	45.86±0.49
E	119.23±0.49**	3.18±0.38**	8.38±0.37**	40.28±0.45**	1.31±0.32***	31.64±0.30***
Kaz. early						
C	126.38±0.48	5.68±0.47	10.24±0.49	42.40±0.65	3.03±0.23	43.41±0.58
E	108.16±0.35***	3.15±0.36***	8.28±0.44*	37.08±0.47***	1.52±0.47*	35.44±0.41***
<i>B. distachyon</i>						
C	21.63±0.46	14.44±0.65	2.94±0.33	51.04±0.68	0.22±0.01	4.01±0.27
E	12.01±0.45***	5.84±0.37***	1.66 ±0.21**	45.16±0.47***	0.16±0.01***	2.80±0.18**
C – control, E – experiment; * under P < 0.05; ** under P < 0.01; *** under P < 0.001 comparative to control						

A comparative analysis of the effect of the pathogen on wheat genotypes shows a significant decrease in the indices of quantitative traits in infected plants (Table 1). Structural analysis of main spike traits such as “length”, “number of grains” and “grain weight” revealed that length of the main spike is 2.94 ± 0.33 cm in control, while experiment’s significantly decreases to 1.66 ± 0.21 cm. The trait “number of grains” is reduced by 12%. The grain weight of the main spike of *B. distachyon* under pathogen influence decreased by 28%. The main indicator of productivity elements “1000 grains weight” significantly decreases by 31% (4.01 ± 0.27 g – control and 2.80 ± 0.18 g – experiment). Wheat grains are frail, especially in the Kaz. early, e.g. the weight of grain from the main spike of Kaz. early in control plants – 3.03 ± 0.23 g, after infection – 1.52 ± 0.47 g, 1000 grains weight in

the control is 43.41 ± 0.58 g, and after infection with the pathogen – 35.44 ± 0.41 g.

Symptoms of infection were recorded on the 7th day, which on the upper side of leaves, less on leaf vaginas as in the form of brown pustules (uredinia) of 0.5-2.0 mm in diameter were manifested.

Immunological analysis results are presented in Table 2. Immunological evaluation revealed maximum resistance to brown rust in *B. distachyon* plants at primary and secondary screening (67MR and 12MS, respectively). The Kaz. early characterized by moderate resistance to rust during at primary screening showed relatively high susceptibility at adult stage (60-70S). The Kaz. 19 variety with relative resistance at secondary screening was moderately susceptible.

Under contamination with a pathogen, grain protein content did not change in Kaz. 19 and Kaz. early varieties (Table 3).

Table 2 – Immunological screening of *B. distachyon* and wheat plants for resistance to *P. recondita*

Variants of experiments	Bd21	Kaz. early	Kaz. 19
	Degree of damage		
Control	75R	53MR	83MR
Treatment by <i>Puccinia recondita</i>	Primary screening		
	67MR	40MS	39MR
	Secondary screening		
	12MS	65S	45MS
R – resistant type of the reaction; MR – moderately stable; MS – moderately susceptible; S – susceptible			

Table 3 – *P. recondita* influence on protein content in wheat and *B. distachyon* grain

Variants of experiments	Protein content in grain, %
Kaz.19	
control	15.28 ± 0.04
experiment	15.16 ± 0.05
Kaz.early	
control	15.22 ± 0.11
experiment	15.12 ± 0.08
<i>B. distachyon</i>	
control	14.96 ± 0.13
experiment	14.66 ± 0.11

The pathogen also did not affect grain protein content in Bd21 ($14.96 \pm 0.13\%$ – control, and $14.66 \pm 0.11\%$ – experiment).

The functional properties of storage proteins are of great importance in nutrition and in industrial transformation. The spectra of glutenins and gliadins are reliable genetic characteristics of any variety; they allow determining the nature of the inheritance of alleles of the initial and hybrid forms.

Analysis of storage proteins in seeds of *B. distachyon* and wheat was carried out in alkaline (SDS-Na electrophoresis) and acidic systems. Comparative analysis of the composition of storage proteins in a grain of healthy plants (control – c) and grain of plants infected with the pathogen (experiment – o) showed the following. By the composition of the high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GS), Kaz. early has a 2* subunit encoded by the *Glu1A* locus, 7+9 subunits encoded by the *Glu1B*

locus and 5+12 subunits encoded by the *Glu1D* locus. The composition of HMW-GS in Kaz. 19-2*; 7*+9; 5+10. It is these subunits, which contribute to the potential baking quality, are highly ranked and the total quality assessment for these varieties for glutenin is 9 points. The effect of the pathogen on HMW-GS is not significantly expressed; however, the intensity of the bands in the gliadin and HMW-GS zone is diminished (shown on Figure 3).

In the spectrum of wheat prolamins (gliadins) fractionated in the acidic system, changes in the accumulation of components under the influence of the pathogen are clearly noted. The prolamins spectrum of wheat is usually divided into α , β -, γ - and ω -bands. In the experimental variants of both wheat varieties, the intensity of manifestation of the component ω 9 (on Figure 9, B indicated by an arrow) is considerably weaker in comparison with the control samples.

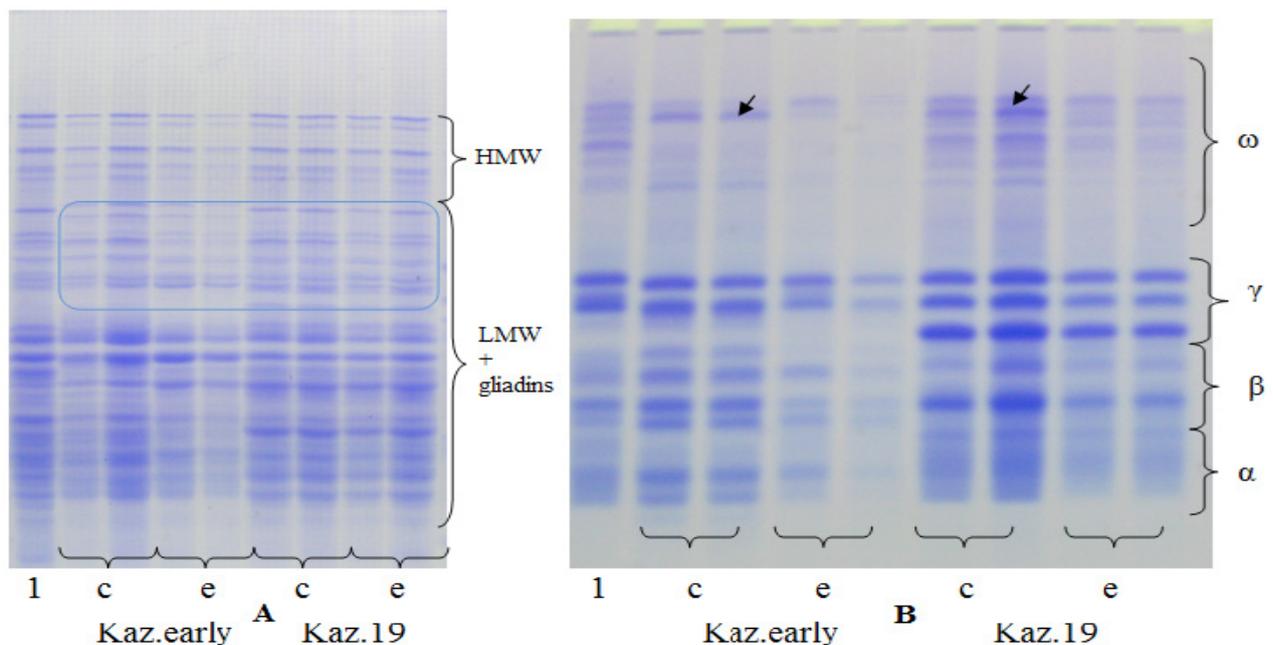


Figure 3 – Spectrum of storage proteins in soft wheat in alkaline (A) and acidic (B) electrophoretic systems.

Note: 1– reference variety of winter soft wheat Bogarnaya 56, c – control, e – experiment, HMW – high molecular weight, LMW – low molecular weight

It is known that slow-moving components ω of the wheat zone (8 and 9) are controlled by *D* genome and affect the baking parameters. It can be assumed that the damage to plants by the pathogen negatively affects the quality. The weakening of the intensity of the components in the experimental samples was also noted for the

gliadin bands – α , β -, γ . The data obtained shows that the pathogen causes changes in the accumulation of a number of components of the storage proteins in wheat seeds.

The reaction of *B. distachyon* plants to the infection was studied on the spectrum of storage proteins fractionated in both systems (Figure 4).

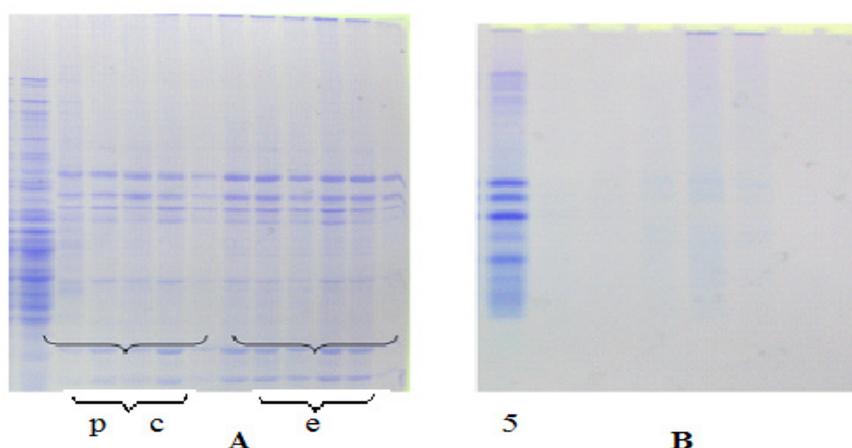


Figure 4 – Electrophoregrams of storage proteins of *B. distachyon* in alkaline (A) and acidic (B) systems.
Note: p – prolamines, c – control, e – experiment

The spectrum of storage proteins of *B. distachyon* seeds, obtained by SDS Na-electrophoresis (Figure 4, A), does not have slowly moving HMW-GS analogous to wheat grains, barley glutenins. Components in the middle part of the gel, apparently, are not prolamines, because when fractionated in an acidic system, these proteins are not detected or present in traces (Figure 4, B).

Also in the spectrum of the wild grass, there are fast-moving proteins that belong in wheat to the albumin-globulin fraction. In the spectrum of *B. distachyon* storage proteins, there is no decrease in the intensity of manifestation of the components of the protein spectrum in the experiment relatively to control. The reduction of the intensity of expression in the spectrum of storage proteins of *B. distachyon*

is not observed in the experimental samples in comparison to control. Soluble proteins, including lectins, due to their physicochemical properties, play an important role in plant adaptation. Accumulation of lectins is closely related to the induction of the host plant stability. Interaction of lectins with carbohydrate components of phytopathogens can trigger, in response to microbial infection, a chain of protective reactions in the host plant [23-25].

A comparative study of soluble protein content in the leaves of *B. distachyon* and wheat seedlings showed that its content in *B. distachyon* leaves (0.464 ± 0.03 mg/ml) statistically reliably exceeds its content in soft wheat by 40-42%, in the roots, such difference varies within the limits of 19-36% (Table 4).

Table 4– Comparative study of soluble protein content in leaves and roots of soft wheat and *B. distachyon* seedlings before and after infection with the pathogen

Object of study	Content of soluble protein, mg/ml	
	in leaves	in roots
before infection with the pathogen		
<i>B. distachyon</i>	0.464±0.03	0.11±0.003
Kaz. 19	0.186±0.01***	0.07±0.01**
Kaz. early	0.195±0.01***	0.09±0.01
after infection with the pathogen		
<i>B. distachyon</i>	0.452±0.01	0.10±0.01
Kaz. early	0.210±0.01***	0.09±0.01
Kaz. 19	0.172±0.02***	0.06±0.02

* – under $P < 0.005$, ** – under $P < 0.01$, *** – under $P < 0.001$ as compared to control

The data obtained (Table 4) also shows alterations in the protein content in the roots of wheat and *B. distachyon* after infection with *P. recondita*. The decrease in protein content in Kaz. 19 is 14.3%, and in *B. distachyon*, 9.1%. At the same time, the Kaz. early shows an increase of 12.5%. It is known that suppressors of the fungus, inhibit plant resistance to infection and the protective biosynthetic activity of damaged tissues, immunosuppressors are natural antagonists of elicitors and induce in plants a susceptibility to diseases. It can be proposed that the reaction of plants to the influence of the phytopathogen is associated with a decrease in the rate of formation of protective reactions and inhibition of the biosynthetic activity in affected tissues, including activation of soluble proteins [26-28].

In plants, free proline accumulates in response to various abiotic and biotic stresses: water deficiency, salinization, pathogen infection, etc. [29-31]. According to the results of the experiment, the proline content of *B. distachyon* control plants is almost two times lower than that in soft wheat varieties. After infection with *P. recondita*, the content of free proline in the leaves of seedlings in Kaz. 19 variety statistically increases by 43% in comparison with control, in Kaz. early by 59%, and in *B. distachyon* – 30% (Table 5).

A change in the activity of enzymes of metabolism is one of the significant criteria changes the genetic apparatus exposed to mutagens. In this regard, of particular interest is the study of the activity of several key enzymes of antioxidant system in

mutant genotypes as compared to the initial variety. The study of enzymatic activity makes it possible to judge the intensity of the metabolism of the plant body, and more reliably estimate the vitality of these mutant genotypes.

SOD is a metalloenzyme that performs a key function in the mechanism of protection against oxidative stress in all aerobic organisms. Catalyzes the decomposition of O_2^- to O_2 and H_2O_2 . The study of SOD activity shows that before the infection with the pathogen, its content in the leaves of the studied wheat varieties (control) equals to 18-29 μg protein/min, whereas, in *B. distachyon*, this indicator is lower. Plant infection results in an increase in enzyme activity of 37 and 24% relatively to control in wheat varieties, Kaz. early and Kaz. 19, while *B. distachyon* does not show significant changes in enzyme activity. Activation of SOD with an increase in the effect of superoxide radicals on plants presumably provides protection of plant cells and tissues against oxidative damage.

The study of SOD activity showed that before the pathogen was damaged, its content in the leaves of the studied wheat varieties (control) was 18-29 μg of protein/min, whereas in *B. distachyon* this indicator was lower (Figure 5). Infection of plants led to an increase in enzyme activity by 37 and 24% relative to the control in wheat varieties Kaz. early and Kaz. 19, while *B. distachyon* showed no significant changes in the activity of the enzyme. Activation of SOD while increasing the effects of superoxide radicals on plants presumably protects plant cells and tissues from oxidative damage.

Table 5 – Free prolin content in seedlings of wheat and *B. distachyon* under *P.recondita* action

Variants of experiments	Free prolin content in wheat and <i>B. distachyon</i> , mg/g	
	leaves	roots
<i>B.distachyon</i>		
control	0.23±0.02	0.17±0.02
experiment	0.30±0.01*	0.21±0.01
Kaz.19		
control	0.39±0.005	0.18±0.01
experiment	0.56±0.03**	0.25±0.01*
Kaz.early		
control	0.47±0.02	0.12±0.01
experiment	0.75±0.03***	0.19±0.02*
* – under P<0.005, ** – under P<0.01, *** – under P<0.001 as compared to control		

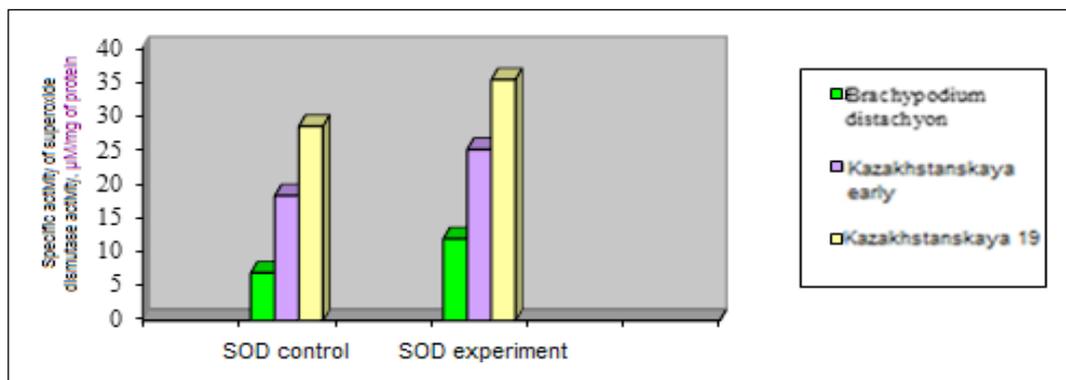


Figure 6 – Comparative analysis of SOD activity before and after the pathogen attack

The enzymes of nitrogen metabolism are of great importance in the processes of plant metabolism. Among the enzymes of nitrogen metabolism, the most important are enzymes of the metabolism of the amino acid of the nitrogen exchange – glutamate, which ensures the assimilation of mineral nitrogen and the synthesis of all amino acids. It is known that the level of enzyme complex of malate dehydrogenase and glutamate oxaloacetate aminotransferase (EC MDG-GOAT) activity plays an important role in the detoxification of protein degradation products, and its reduction promotes an increase in the synthesis of aspartate, which is necessary for the synthesis of purines and other valuable metabolites.

The results of the experiment show that the activity of nitrogen exchange enzymes MDG-GOAT and glutamate dehydrogenase (GDG) in wheat varieties before treatment with the pathogen exceeds its activity in *B. distachyon* by 3 and 2 times, respectively. GDG activity in *Brachypodium* before the infection with the pathogen is 31.59 ± 0.04 μM/mg protein, in Kaz. early is 73.46 ± 0.01 μM/mg protein, and in Kaz. 19 – 78.63 ± 0.01 μM/mg protein. In turn, the activity of EC in Kaz. 19, as more resistant to leaf rust, is significantly higher than in the susceptible variety Kaz. early (329.23 ± 0.01 and 267.12 ± 0.01 μM/mg protein, respectively). Since EC MDG-GOAT participates in a nontoxic pathway of catabolism of glutamate, it can be assumed that the high activity of EC promotes plant resistance to rust.

The analysis of the results (Table 6) showed that under the action of the pathogen, there is no significant increase in the activity of GDG in *B. distachyon* as compared to control (4%), in the susceptible variety of Kaz. early, the activity of GDG increased by

6.4%, in the case of the resistant variety Kaz. 19 enzyme activity increases by 5.7%. In turn, there was an increase in the activity of MDG-GOAT in *B. distachyon* by 4.7%, in Kaz. 19 – 6.4%, and in Kaz. early – 10%. It is known for genetically-selection works that wheat is of interest with reduced activity of GDG since this enzyme releases toxic ammonia destroying biological membranes as a result of the oxidative deamination reaction. The level of EC MDG-GOAT activity plays an important role in the detoxification of the protein degradation products formed within the processes of biotic and abiotic stresses.

Plants with reduced activity of GDG and high MDG-GOAT survive better under conditions of infection and retain high productivity, which may be justified by increased resistance to adverse effects of biotic and abiotic stress factors of the environment in *B. distachyon* as a wild grass.

It is known that malate dehydrogenase (MDG) plays a central role in changing metabolic processes when adapting plants to the environment.

According to the Table 7, in *B. distachyon*, the activity of MDG after infection with the pathogen slightly decreases to 27.17 ± 0.01 μM/mg of protein. Wheat varieties show an increase in the activity of MDG relatively to control: 20% for Kaz. early and 17% for Kaz. 19, and equals to 47.94 ± 0.02 and 42.66 ± 0.02 μM/mg, respectively.

It is known that ADH plays a central role in the anaerobic metabolism of plants. As is known, the enzyme ADH in plant cells is necessary to maintain equilibrium in the system of ethanol-acetaldehyde. It is known that an increase in the concentration of ethanol and acetaldehyde is often accompanied by a decrease in the germination of seeds while maintaining their high viability [32].

Table 6 – Comparative study of specific activity of nitrogen exchange enzymes in leaves of soft wheat and *B. distachyon* seedlings before and after the pathogen infection

Variants of the experiment	Specific activity of enzymes, $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein	
	GDG	EC MDG-GOAT
<i>B. distachyon</i>		
Control	31.59 \pm 0.04	110.22 \pm 0.03
Upon infection with <i>P.recondita</i>	32.98 \pm 0.02***	115.49 \pm 0.03***
Kaz. early		
Control	73.46 \pm 0.01	267.12 \pm 0.01
Upon infection with <i>P.recondita</i>	78.16 \pm 0.01***	239.40 \pm 0.01***
Kaz. 19		
Control	78.63 \pm 0.01	329.23 \pm 0.01
Upon infection with <i>P.recondita</i>	83.14 \pm 0.01***	350.34 \pm 0.01***
*** – under $P < 0.001$ as compared to control		

The activity of ADH in *B. distachyon* after infection with the pathogen decreases by 6.8% – 82.61 \pm 0.02*** $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein. The activity of ADH in Kaz. early decreases by 4.38% and amounts to 480.19 \pm 0.02 ** $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, while in Kaz. 19 it increases by 2.3% and equals to 530.36 \pm 0.02 ** $\mu\text{M}/\text{mg}$ of

protein. It should be noted that the activity of alcohol dehydrogenase (ADH) in *B. distachyon* is quite low – 5.8 times less than in wheat plants and equals to 88.71 \pm 0.01 $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein. ADH activity in Kaz. early and Kaz. 19 is close to 502.18 \pm 0.01 and 518.40 \pm 0.01 $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, respectively.

Table 7 – Activity of enzymes ($\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein) of energy metabolism in leaves of soft wheat and *B. distachyon* seedlings before and after the infection with the pathogen

Variants of the experiment	Specific activity of enzymes, $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein	
	MDG	ADH
<i>B. distachyon</i>		
Control	30.24 \pm 0.02	88.71 \pm 0.01
Upon infection with <i>P.recondita</i>	27.17 \pm 0.01***	82.61 \pm 0.02***
Kaz. early		
Control	39.62 \pm 0.02	502.18 \pm 0.01
Upon infection with <i>P.recondita</i>	47.94 \pm 0.02***	480.19 \pm 0.02***
Kaz. 19		
Control	36.16 \pm 0.01	518.40 \pm 0.01
Upon infection with <i>P.recondita</i>	42.66 \pm 0.02***	530.36 \pm 0.02***
*** – under $P < 0.001$ as compared to control		

Conclusion

Comparative study of molecular genetic and biochemical features of the model of wild cereal *B. distachyon* with related cereal grains enables

us to understand mechanisms of resistance and increase of resistance of wheat plants to both abiotic and biotic factors. A change in the activity of enzymes of metabolism is one of the significant criteria changes the genetic apparatus exposed to

mutagens. In this regard, of particular interest is the study of the activity of several key enzymes of nitrogen and energy metabolism in mutant genotypes as compared to the initial variety, which makes it possible to judge the intensity of the metabolism in plant, and more reliably estimate the vitality of these mutant genotypes. The increased interest to the composition of storage proteins in wheat is associated with functional significance of specific proteins in determination of the baking properties. Refinement of genetic control and the identification of new and rare protein subunits, detected in the course of studying the collection and breeding material is necessary for a reliable assessment of samples, as well as for the expansion of the genetic basis of cultivars created by examining the value of genotypes with specific variants of

alleles and their inclusion in the selection process. As such, the results of morphometric study show that the pathogen exerted an inhibitory effect on the parameters of the elements of productivity in wheat and *B. distachyon*. Besides, the activity of nitrogen exchange enzymes MDG-GOAT and glutamate dehydrogenase in wheat varieties before treatment with the pathogen exceeds its activity in *B. distachyon* by 3 and 2 times, respectively; the activity of MDG after infection with the pathogen slightly decreases to $27.17 \pm 0.01 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein. Plants with reduced activity of GDG and high MDG-GOAT survive better under conditions of infection and retain high productivity, which may be justified by increased resistance to adverse effects of biotic and abiotic stress factors of the environment in *B. distachyon* as a wild grass.

References

- 1 Tilman D., Balzer C., Hill J., Befort B. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – Vol. 108. – P. 20260–20264.
- 2 Food and Agriculture Organization of the United Nations. Country fact sheet on food and agriculture policy trends: Kazakhstan. – 2017. – P. 1-6.
- 3 Figueroa M., Castell-Miller C., Li F., Hulbert S., Bradeen J. Pushing the boundaries of resistance: insights from *Brachypodium-rust* interactions // Front Plant Sci.. – 2015. – Vol. 6. – P. 1-11.
- 4 Müller B., Grossniklaus U. Model organisms – a historical perspective // J Proteomics. – 2010. – Vol. 73. – P. 2054–2063.
- 5 Ayliffe M., Singh D., Park R., Moscou M., Pryor T. Infection of *Brachypodium distachyon* with selected grass rust pathogens // MPMI. – 2013. – Vol. 26. – P. 946–957.
- 6 Койшибаев М. Болезни зерновых культур. – А.: Бастау. – 2002. – С. 367.
- 7 Кочоров А., Сагитов А., Аубакирова А., Алишеров Ж. Распространение ржавчинных болезней пшеницы в Казахстане // Национальная академия микологии. – 2013. – С. 163-165.
- 8 Неттевич Э. Рождение и жизнь сорта. – М.: Московский рабочий. – 1978. – С. 175.
- 9 Bushnell W., Roelfs A. The Cereal Rusts: origins, specificity, structure, and physiology. – Academic Press, Inc. – 1984. – P. 546.
- 10 Mullins E. Engineering for disease resistance: persistent obstacles clouding tangible opportunities // Pest Manag Sci. – 2015. – Vol. 71. – P. 645-651.
- 11 Shulembayeva K., ChUNETOVA Zh., DAULETBAYEVA S., TOKUBAYEVA A., OMIRBEKOVA N., ZHUNUSBAYEVA Zh., ZHUSSUPOVA A. Some results of the breeding and genetic studies of common wheat in the south-east of Kazakhstan // Int J Biol Chem. – 2014. – Vol. 8. – P. 6-10.
- 12 Draper J., Mur L., Jenkins G., Ghosh-Biswas G., Bablak P., Hasterok R., Routledge A. *Brachypodium distachyon*: a new model system for functional genomics in grasses // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 127. – P. 1539-1555.
- 13 Peraldi A., Beccari G., Steed A., Nicholson P. *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat // BMC Plant Biol. – 2011. – Vol. 11. – P. 1-14.
- 14 McIntosh R., Wellings C., Park R. Wheat Rusts: An atlas of Resistance Genes. – Australia: CSIRO. – 1995. – P. 200.
- 15 Бейли Д. Методы химии белка. – М.: Иностран. лит. – 1965. – 284 с.
- 16 Srivastava G.C. Modern Methods in Plant Physiology. – India: New India Publishing. – 2015. – P. 149.
- 17 Rothe G.M. Electrophoresis of Enzymes: Laboratory Methods. – Germany: Springer. – 2011. – 328 p.
- 18 Mathur M., Singh V.K., Mukerji D., Mathur S.N. Colorimetric estimation of glutamate dehydrogenase in leaf tissue of *Vigna mungo* (L.) Hepper // Ann. Bot. – 1983. – P. 105-110.
- 19 McKenzie E., Lees E. Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation and characterization of three forms of the enzyme // Arch Biochem Biophys. – 1981. – Vol. 212. – P. 290-297.
- 20 Calderini D., Dreccer M., Slafer G. Genetic improvement in wheat yield and associated traits. A re-examination of previous results and the latest trends // Plant Breed. – 1995. – Vol. 114. – P. 108-112.
- 21 Морозова З. Методология использования закономерностей морфогенеза колосовых злаков в селекции: научно-методическое пособие. – М.: МАКС Пресс. – 2013. – С. 365.
- 22 Нагрова З., Смочек Я. Продуктивность колоса зерновых культур. – М.: Колос. – 1983. – С. 45.

- 23 Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем. – 2001. – 159 с.
- 24 Молодченкова О., Адамовская В., Цисельская Л., Сагайдак Т. Выделение и свойства лектинов клеточных стенок из проростков пшеницы при инфицировании грибными патогенами и действии салициловой кислоты // Вестник Харьковского национального аграрного университета серия биология. – 2012. – Т. 26. – С. 54-60.
- 25 Белавя В., Зеленый С., Панюта О. Экспрессия генов лектина и дефенсина у сортов пшеницы Мироновская 808 и Roazon при инфицировании *Pseudocercospora herpotrechoides* // Biopolimers and Cell. – 2010. – Т. 26. – С. 45-50.
- 26 Hare P., Cress W., Staden J. Proline synthesis and degradation: a model for elucidating stress related signal transduction // J Exp Bot. – 1999. – Vol. 50. – P. 413-434.
- 27 Кузнецов В., Шевякова Н. Проллин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. раст. – 1999. – Т. 46. – С. 321-336.
- 28 Ozgur R., Uzilday B., Sekmen A., Turkan I. Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes // Funct. Plant Biol. – 2013. – Vol. 40. – P. 832-847.
- 29 Qamar A., Mysore K., Senthil-Kumar M. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens // Front Plant Sci. – 2015. – Vol.6. – P. 1-9.
- 30 Cecchini N., Monteoliva M., Alvarez M. Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis // Plant Physiol. – 2011. – Vol. 155. – P. 1947-1959.
- 31 Barker A., Pilbeam D. Handbook of Plant Nutrition. – CRC Press. – 2015. – P. 773.
- 32 Kodde J., Buckley W., de Groot C., Retiere M., Zamora A., Groot S. A fast ethanol assay to detect seed deterioration // Seed Sci Res. – 2011. – P. 1-8.

References

- 1 Ayliffe M., Singh D., Park R., Moscou M., Pryor T. (2013) Infection of *Brachypodium distachyon* with selected grass rust pathogens. *MPMI*, vol. 26, pp. 946-957.
- 2 Barker A., Pilbeam D. (2015) Handbook of Plant Nutrition. CRC Press, p. 773.
- 3 Bailey D. (1965) *Metody himii belka [Techniques in protein chemistry]*. M.: Inostr. Lit, p. 284.
- 4 Belava V., Zelenyj S., Panjuta O. (2010) Jekspressija genov lektina i defensina u sortov pshenicy Mironovskaja 808 i Roazon pri inficirovanii pseudocercospora herpotrechoides [Expression of lectin and defensin genes in wheat varieties Mironovskaya 808 and Roazon with infection of *Pseudocercospora herpotrechoides*]. *Biopolimers and Cell*, vol. 26, pp. 45-50.
- 5 Bushnell W., Roelfs A. (1984) *The Cereal Rusts: origins, specificity, structure, and physiology*. Academic Press, Inc., p. 546.
- 6 Calderini D., Dreccer M., Slafer G. (1995) Genetic improvement in wheat yield and associated traits. A re-examination of previous results and the latest trends. *Plant Breed.*, vol. 114, pp. 108-112.
- 7 Cecchini N., Monteoliva M., Alvarez M. (2011) Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, vol. 155, pp. 1947-1959.
- 8 Draper J., Mur L., Jenkins G., Ghosh-Biswas G., Bablak P., Hasterok R., Routledge A. (2011) *Brachypodium distachyon*: a new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.*, vol. 127, pp. 1539-1555.
- 9 Figueroa M., Castell-Miller C., Li F., Hulbert S., Bradeen J. (2015) Pushing the boundaries of resistance: insights from *Brachypodium-rust* interactions. *Front Plant Sci.*, vol. 6, pp. 1-11.
- 10 Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017) Country fact sheet on food and agriculture policy trends: Kazakhstan, pp. 1-6.
- 11 Hare P., Cress W., Staden J. (1999) Proline synthesis and degradation: a model for elucidating stress related signal transduction. *J Exp Bot*, vol. 50, pp. 413-434.
- 12 Kojshibaev M. (2002) *Bolezni zernovyh kul'tur [Diseases of grain crops]*. A.: Bastau, p. 367.
- 13 Kochorov A., Sagitov A., Aubakirova A., Alisherov Zh. (2013) Rasprostranenie rzhavchinyh boleznej pshenicy v Kazahstane [Distribution of wheat rusts in Kazakhstan]. *Nacional'naja akademija mikologii*, pp. 163-165.
- 14 Kodde J., Buckley W., de Groot C., Retiere M., Zamora A., Groot S. (2011) A fast ethanol assay to detect seed deterioration. *Seed Sci Res*, pp. 1-8.
- 15 Kuznecov V., Shevjakova N. (1999) Proline pri stresse: biologicheskaja rol', metabolizm, reguljacija [Proline under stress: biological role, metabolism, regulation]. *Fiziol rast*, vol. 46, pp. 321-336.
- 16 Mathur M., Singh V.K., Mukerji D., Mathur S.N. (1983) Colorimetric estimation of glutamate dehydrogenase in leaf tissue of *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Ann. Bot.*, pp. 105-110.
- 17 McIntosh R., Wellings C., Park R. (1995) *Wheat Rusts: An atlas of Resistance Genes*. Australia: CSIRO, p. 200.
- 18 McKenzie E., Lees E. Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation and characterization of three forms of the enzyme. *Arch Biochem Biophys*, vol. 212, pp. 290-297.
- 19 Molodchenkova O., Adamovskaja V., Cisel'skaja L., Sagajdak T. (2012) Vydelenie i svojstva lektinov kletocnyh stенок iz prorostkov pshenicy pri inficirovanii gibnymi patogenami i dejstvii salicilovoj kisloty [Extraction and properties of cell wall lectins from infected with fungal pathogens and affected by salicylic acid wheat germs]. *Vestnik Har'kovskogo nacional'nogo agrarnogo universiteta serija biologija*, vol. 26, pp. 54-60.
- 20 Morozova Z. (2013) Metodologija ispol'zovanija zakonomernostej morfogeneza kolosovyh zlakov v selekcii: nauchno-metodicheskoe posobie [Methodology of using the morphogenesis of spiked cereals patterns in breeding: scientific-methodological manual]. M.: MAKSS Press, p. 365.

- 21 Mullins E. (2015). Engineering for disease resistance: persistent obstacles clouding tangible opportunities. *Pest Manag Sci*, vol. 71, pp. 645-651.
- 22 Müller B., Grossniklaus U. (2010) Model organisms – a historical perspective. *J Proteomics*, vol.
- 23 Natrova Z., Smochek Ja. (1983) Produktivnost' kolosa zernovyh kul'tur [Productivity of the ear of cereals]. M.: Kolos, p. 45.
- 24 Nettevich Je. (1978) Rozhdenie i zhizn' sorta [Birth and life of a variety]. M.: Moskovskij rabochij, p. 175.
- 25 Ozgur R., Uzilday B., Sekmen A., Turkan I. (2013) Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Funct Plant Biol*, vol. 40, pp. 832–847.
- 26 Peraldi A., Beccari G., Steed A., Nicholson P. (2011) *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. *BMC Plant Biol.*, vol. 11, pp. 1-14.
- 27 Qamar A., Mysore K., Senthil-Kumar M. (2015) Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. *Front Plant Sci*, vol. 6, pp. 1-9.
- 28 Rothe G.M. (2011) *Electrophoresis of Enzymes: Laboratory Methods*. Berlin: Springer, p.328.
- 29 Shakirova F. (2001) Nespecificheskaja ustojchivost' rastenij k stressovym faktoram i ee reguljacija [Plants nonspecific resistance to stress factors and its regulation]. Ufa: Gilem, p. 159.
- 30 Shulembayeva K., ChUNETOVA Zh., Dauletbayeva S., Tokubayeva A., Omirbekova N., Zhunusbayeva Zh., Zhussupova A. (2014) Some results of the breeding and genetic studies of common wheat in the south-east of Kazakhstan. *Int J Biol Chem*, vol. 8, pp. 6-10.
- 31 Srivastava G.C. *Modern Methods in Plant Physiology*. – India: New India Publishing. – 2015. – P. 149.
- 32 Tilman D., Balzer C., Hill J., Befort B. (2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 108, pp. 20260–20264.

Рамазанова А.А.¹, Ерназарова Г.И.², Турашева С.К.³

¹Қазақ мемлекеттік қыздар педагогикалық университеті,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: r.aliya_1989@mail.ru

²e-mail: gulzira.yernazarova@kaznu.kz

³e-mail: svetlana.turasheva@kaznu.kz

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

EICHHORNIA CRASSIPES СУ ӨСІМДІГІНІҢ ЖАПЫРАҚ ЖӘНЕ ТАМЫРЫНДАҒЫ БИОЛОГИЯЛЫҚ БЕЛСЕНДІ ЗАТТАР

Қазіргі таңда биотехнологиялық өнім көздері болып табылатын кең ауқымды биологиялық белсенді заттар құрамы кездесетін өсімдіктерді зерттеу өзекті мәселе болып табылады. Бұл зерттеу жұмысының негізгі мақсаты Алматы облысының көлшіктерінде кең таралған *Eichhornia crassipes* су өсімдігін модельді тәжірибе жағдайында өсіріп, құрамындағы биологиялық белсенді заттарды жинақтау деңгейін анықтау болды. Осы тұрғыдан алғанда *Eichhornia crassipes* жоғары сатыдағы су өсімдігін перспективалы объект ретінде қарастыруға болады, себебі өсімдіктердің әртүрлі биологиялық белсенді заттары толық зерттелмеген нысана. Зерттеудің практикалық маңызы көлшіктер мен суқоймаларындағы өсімдіктердің биологиялық белсенді заттарын анықтап медициналық құндылығын айқындау. Сондықтан, *Eichhornia crassipes* өсімдігінің жер үсті (жапырағы мен сабағы) және жер асты бөлігінен (тамырынан) биологиялық белсенді заттардың сандық және сапалық құрамы анықталды. Тәжірибе нәтижесі бойынша сапалық көрсеткіштерден биологиялық белсенді заттар құрамы бойынша ең көп мөлшерде илік заттар, фенол қышқылдары, флаваноидтар, полисахаридтер айқындалды. Ал сандық көрсеткіштер бойынша, өсімдіктің жер үсті бөлігінде илік заттар мөлшері – 6,73%, полисахаридтер – 5,91%, флаваноидтар – 3,39%, фенол қышқылдары – 1,06%, кумариндер – 0,82%. Тамыр құрамында да ең көп кездесетін биологиялық белсенді заттарға илік заттар – 7,48%, полисахаридтер – 2,64%, антрахинондар – 2,59%, белоктар – 0,73%, алкалоидтар мөлшері – 0,13% екені анықталды. Алынған нәтижелер биотехнологиялық мамандықтар зертханасында ғылыми-зерттеу эксперименттерін жүргізу кезінде зертханалық жұмыстарды орындауда және өсімдіктердің биологиялық белсенді заттарының құрамын анықтау үшін зертханалық жұмыстар ретінде пайдаланылады.

Түйін сөздер: *Eichhornia crassipes*, биологиялық белсенді заттар, илік заттар, полисахаридтер.

Ramazanova A.A.¹, Yernazarova G.I.², Turasheva S.K.³

¹Kazakh State Women's Teacher Training University,
Kazakhstan, Almaty, e-mail: r.aliya_1989@mail.ru

²e-mail: gulzira.yernazarova@kaznu.kz

³e-mail: svetlana.turasheva@kaznu.kz

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Biological active substances in the leaves and root of the aquatic plant *Eichhornia crassipes*

Currently relevant are studies of plants, which contain a large number of biological active substances of different composition, that are sources of biotechnological products. The main purpose of this research work in the conditions of model experience was to determine the level of accumulation of biologically active substances contained in the aquatic plant *Eichhornia crassipes*, distributed in the lakes of Almaty region. *Eichhornia crassipes* can be considered as a promising object of higher aquatic plants, for which the composition of biologically active substances has not yet been studied. The practical significance of the study is to determine the medical value of biologically active substances of plants in lakes and reser-

voirs. We have determined the quantitative and qualitative composition of biological active substances from vegetative aboveground (leaves and stems) and underground parts (roots) of *Eichhornia crassipes* plant. According to the results of qualitative indicators were identified the biological active substances prevailing in composition, such as phenolic acids, flavonoids and polysaccharides. According to the results of quantitative indicators, in the aboveground part of plants the content of tannins amounted to 6.73%, polysaccharides 5.91%, flavonoids 3.39%, phenolic acids 1.06%, coumarins 0.82%, the most common biological active materials are tannins 7.48%, polysaccharides 2.64%, anthraquinones 2.59%, proteins 0.73%, alkaloids 0.13%. The obtained results are used as laboratory work to perform laboratory work at for research experiments in the laboratory biotechnology specialties and to determine the content of biologically active substances of plants.

Key words: *Eichhornia crassipes*, biologically active substances, tannins, polysaccharides.

¹Рамазанова А.А., ²Ерназарова Г.И., ³Турашева С.К

¹Казахский государственный женский педагогический университет,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: r.aliya_1989@mail.ru

²e-mail: gulzira.yernazarova@kaznu.kz

³e-mail: svetlana.turasheva@kaznu.kz

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

Биологически активные вещества в листьях и корнях водного растения *Eichhornia crassipes*

В настоящее время актуальными являются исследования растений, в которых содержится большое количество биологически активных веществ, различных по составу, являющихся источниками биотехнологической продукции. Основной целью этой исследовательской работе в условиях модельного опыта является определение уровня накопления биологически активных веществ, содержащихся в водном растении *Eichhornia crassipes*, широко распространенном в озерах Алматинской области. *Eichhornia crassipes* можно рассматривать как перспективный объект из высших водных растений, для которых еще не исследован состав биологически активных веществ. Практическая значимость исследования заключается в определении медицинской ценности биологически активных веществ растений в озерах и водоемах. Нами был определен количественный и качественный составы биологически активных веществ из вегетативных надземных (листьев и стеблей) и подземных частей (корней) растений *Eichhornia crassipes*. По результатам качественных показателей были выявлены преобладающие по составу биологически активные вещества, такие как фенольные кислоты, флаваноиды, полисахариды. По результатам количественных показателей, в надземной части растений содержание дубильных веществ составило – 6,73%, полисахаридов – 5,91%, флавоноидов – 3,39%, фенольных кислот – 1,06%, кумаринов – 0,82 %, соответственно наиболее распространенными биологически активными веществами являлись: дубильные вещества – 7,48%, полисахариды – 2,64%, антрахиноны – 2,59%, белки – 0,73%, алкалоиды – 0,13%. Полученные результаты используются в качестве лабораторных работ для выполнения лабораторных работ при проведении научно-исследовательских экспериментов в лаборатории биотехнологических специальностей и для определения содержания биологически активных веществ растений.

Ключевые слова: *Eichhornia crassipes*, биологически активные вещества, дубильные вещества, полисахариды.

Кіріспе

Қазіргі заманғы үрдістер биотехнология ғылымын дамытудағы шикізат көздерін кеңейтуді талап етеді. Медицина, азық – түлік, жем – шөптік өнеркәсіптерінде биологиялық белсенді заттардың қажеттілігі артуына байланысты, ғалымдар әр түрлі пайдалы шикізат көздеріне назар аударуда. Осы тұрғыдан алғанда *Eichhornia crassipes* жоғары сатыдағы су өсімдігін перспективалы объект ретінде қарастыруға болады, себебі оларда әртүрлі биологиялық белсенді заттар құрамы: алка-

лоидтар, терпеноидтар, илік заттар, полисахаридтер, амин қышқылдары және т.б заттар көптеп кездеседі деген мәліметтерге орай, біздің зерттеу жұмысымызда Алматы облысының көлшіктерінде кең таралған *Eichhornia crassipes* су өсімдігін моделді тәжірибе жағдайында өсіріп құрамындағы биологиялық белсенді заттарды жинақтау деңгейін анықтауды жоспарға кіргіздік. Алдын – ала *Eichhornia crassipes* өсімдігі туралы мәліметтерге тоқталайық.

Eichhornia crassipes су өсімдігі *Pontedericeae* тұқымдасына жататын екінші атауы су гиацинті атауымен танымал. Өсімдік қалың жасыл жапы-

рақты және күлгін түсті әдемі лаванда тәрізді гүлдерден тұрады. *Eichhornia crassipes* қоректік заттарға бай сулы орталарда өседі. Сонымен қатар, оның әдемі күлгін түсті гүлдері әйгілі сәндік өсімдік ретінде де өсіріледі. Көбінесе вегетативтік өсімді мүшелері арқылы көбейіп таралады және тұқымдары тіршілік етуі мен колония құруында үлкен роль атқарады. Өсімді мүшелерінің жаппай су көзінде таралуы, бөгеттер, канализация және эвтрофикацияның жинақталуына әкелуі мүмкін. Бұл өсімдіктер қосымша тыңайтқыш заттарды сіңіру арқылы жылдам өсуге бейім, сол себепті өсімдіктің сабағы ауа көпіршіктеріне толы, қанық жасыл түсті болып келеді [1,2].

Eichhornia crassipes басты қасиеті оның қоректік ортада және қоршаған орта жағдайларында кең ауқымда өсу қабілетіне ие. Өсімдік басқа да табиғи объектілермен бәсекелесе отырып, таңғажайып көп мөлшерде дами алады. Өсу қарқыны басқа өсімдіктермен салыстырғанда 12 күнде екі есеге дейін дамиды. Биомассаның тез көбею қарқындылығы өсу ортасы мен су сапасына кері әсерін тигізуі мүмкін. Сонымен қатар өсімдіктің су бетінде қарқынды көбеюі адамдардың шаруашылық іс – әрекеттеріне, мысалы егіс жерлерін суаруға, балық аулауға, қайықтың қозғалуына кедергі жасайды [3].

Eichhornia crassipes тропикалық және қоңыржай климаттық аймақтарда, тұщы суларда, 28-30°C қолайлы температурада өседі және азот, фосфор, калийді көп мөлшерде талап етеді. Экстремальді табиғат жағдайында соның ішінде, аязда, судың тұздылығы артқан жағдайда тіршілігін жояды, ал су деңгейінің азайған жерлерінде бірнеше ай бойы дымқыл топырақта тіршілік ете алады [4,5].

Eichhornia crassipes-тің вегетативтік мүшелерінің фенол, флаваноидтар, алкалоидтар, амин қышқылдары, полисахаридтер, илік заттар және т.б көптеген метаболиттерден тұрады. Осыған орай *Eichhornia crassipes* су өсімдігінің құрамында кездесетін биологиялық белсенді заттар жөніндегі басқа елдердегі ғалымдардың зерттеулеріне қысқаша шолу жасалды. Мысалы, фенолды қосылыстар өсімдіктер құрамында кездесетін үлкен және әр түрлі ароматты молекулалық топтардан тұратын, екінші реттік метаболиттік заттар болып табылады. *Eichhornia crassipes* жапырақтарын метанолды, этилацетатты және су сығындыларымен экстракциялағанда құрамынан фенолды қосылыстар табылған. *Eichhornia crassipes* өсімдігінің өркендерінің этанолды сығындыларынан 4-метилрезорцин,

2-метилрезорцин, катехол, пирогаллол және п-гидроксибензол, ванильді және салицилді қышқылдар, тамырынан 4-метилрезорцин, 2-метилрезорцин, резорцин, катехол, салицилді қышқылдар ЖҚХ (Жұқа қабатты хромография) зерттеулерінің көмегімен анықталған. ГАХ (Газды адсорбциялайтын хромография) зерттеулерінің көмегімен 1(2,4-дигидроксифенил), 2(4-метокси-3-нитрофенил) өсімдіктің этанолды сығындыларынан идентификацияланған [6].

Фитохимиялық зерттеулер нәтижесінде *Eichhornia crassipes* құрамынан алкалоидтардың бар екені анықталды. ЖҚХ зерттеулерінің нәтижесінде өсімдік өркендерінен және тамырларынан цитизин, томатин, тебаин, кодеин, хинин және никотинді заттар табылған. [7] Медицинада емдік мақсатта әлсіз антисептикалық қасиеті бар терпеноидтар, *Eichhornia crassipes* өсімдігінің вегетативтік мүшелерінен анықталған. Мысалы, ГАХ зерттеу нәтижесінде 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-фитол жапырақтың әр түрлі сығындыларынан идентификацияланды. Өсімдіктің өсуін реттейтін заттар, индол қосылыстары және гиббереллиндер өсімдіктің тамырларынан бөлінді. Ал, каротин өсімдік сығындыларынан әр түрлі әдістермен бөлініп алынған [8].

Стероидты заттар, кампестерол, стигмастерол және ситостерин, гидростигма -4, 22- диен стеролдары өсімдіктің ацетонды сығындыларынан бөлініп алынған [9].

Eichhornia crassipes өсімдігінің жапырақтарынан гликозидтерді синтездеу мөлшері өте жоғары. Гликозидтер, атап айтқанда жүрек гликозидтері өсімдік өркендерінің сулы және хлороформды сығындыларынан анықталған. Өсімдіктердің өсімді мүшелерінің фитохимиялық анализдері бойынша, өсімдіктің тамыры, жапырағы, сабағы, гүлінде моногалактозилдиглицерид және дигалактозилдиглицерид негізінен гликолипидтер және фосфолипидтер, соның ішінде фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин және фосфатидилэтанолламин, пальмитин мен линол қышқылы кездеседі. *Eichhornia crassipes* өсімдігінің сулы сығындысынан сахароза, фруктоза және бос май қышқылдары табылған. Полисахаридті талдауларда гетерополисахаридтерден, соның ішінде D-ксилоза, L-галактоза және L-ларабинозадан тұратындығын көрсетті [10]. Әр түрлі фитохимиялық талдаулар нәтижесінде өсімдік құрамы басқа да метаболиттерден тұратыны анықталған. Мысалы, өсімдіктің хлороформды және мета-

нолды сығындыларынан антрахинон, сапонин, өркендерінен флобатанин, хинон, антрахинон, жүрек гликозидтері табылған [11,12].

Көптеген зерттеушілер, өсімдіктің әр түрлі сығындыларының антимикробтық белсенділігін зерттеген. *Eichhornia crassipes*-тің метанолды сығындыларынан микробтарға (бактериялар мен саңырауқұлақтарға) және судың гүлдеуін тудырушы көк – жасыл балдырлар мен цианобактерияларға қарсы белсенділігі бар екені, қағаз диффузиялық биоанализ көмегімен анықталған. [13]*Eichhornia crassipes* су өсімдігінің *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Penicillium* және *Aspergillus niger* саңырауқұлақтарына қарсы белсенділікті көрсетті, бірақ белсенділік рН концентрацияға және әрекет ету уақытына байланысты болды. Сондай-ақ өсімдіктің метанолды сығындысы *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* және *Xanthomonas compestries* қарсы белсенділік көрсетті [14].

Eichhornia crassipes -тің әр түрлі металлдарға төзімділігі, атап айтқанда Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn әр түрлі концентрацияларында 21 күн бойы жүргізілген тәжірибеде, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза ферменттері белсенділік көрсеткен. Жалпы алғанда Zn концентрацияларында *Eichhornia crassipes* су өсімдігінің антиоксиданттық қабілеті ең төменгі көрсеткішке ие болса, Hg ерітінділерінде ең жоғары белсенділікті көрсеткен. *Eichhornia crassipes* антиоксиданттық қабілеті жоғары болуына байланысты, судағы ауыр металдардың әр түрлі концентрацияларын сіңіру қарқындылығы да жоғары екендігі анықталған [15-16].

Eichhornia crassipes өсімдік жапырақтарының метанолды сығындылары жақпамай түрінде екі түрлі концентрацияда (10% және 15%) дайындалып емдік қасиетінің әсері егеуқұйрықтарға қолданылып сынақ жүргізілген. Жарақаттарды емдеу барысында бақылау нұсқасымен салыстырғанда едәуір жоғары нәтиже көрсеткен. Сонымен қатар, әр түрлі дозадағы су гиацинтінің метанолды сығындысы (50%) (дене салмағының 200 мг / кг – нан 500 мг / кг – дейін) B16F10 үлгідегі швейцариялық гибридті альбинос тышқандардың тері ісігіне қарсы әсері зерттелген. Кейбір фракциялар бауыр ісігіне қарсы таңдамалы антитуморлық белсенділікті көрсетті, ал басқа фракциялар гормонға тәуелді ісіктерге (мойын және сүт безі қатерлі ісігіне) қарсы жоғары басытқылық белсенділікті көрсетті.

Үндістанда кездесетін қосқанаттылар отрядының тармағы *Culex quinquefasciatus* және

Chironomus ramosus Chaudhuri жаппай көбеюіне байланысты олардың жұмыртқалары мен дернәсілдерін жою үшін өсімдіктің тамыр сығындыларынан әр түрлі концентрациялармен әсер еткенде (0,25-2,5%) ларвицидтік, купидидтік, реппелентті белсенділік әсері 100% көрсеткен [17].

Eichhornia crassipes адсорбат ретінде ластанған ортаны қоректік заттардан, органикалық заттардан, ауыр металдардан және т.б. ластаушы заттардан кең ауқымда тиімді түрде жою қабілетіне ие [18].

Eichhornia crassipes өсімдігінің адамдарға және қоршаған ортаға пайдалы көптеген қасиеттерін атап айтуға болады: ауыл шаруашылығында тыңайтқыш, жем – шөп, белок көзі, тамақ өнеркәсібінде, энергия өндірісінде кеңінен қолданылады. Сонымен қатар, жоғары калориялы отын алу, H₂ және CH₄ сұйық отын когенерациясын дайындау үшін қолданылады. Өсімдік талшықтарын каучук өндірісінде, өнімнің қаттылығы мен беріктігін сақтап тұру үшін қолданылады [19].

Қазіргі таңда фармакологиялық мақсаттарда кең ауқымды биологиялық белсенді заттар құрамы кездесетін өсімдіктерді зерттеу өзекті мәселелер болып табылады. Биологиялық белсенді заттар организмде әр түрлі қалпына келтіруші реакцияларға және ферменттердің құрамына кіріп метаболиттік процестерге қатысады. *Eichhornia crassipes* өсімдігінің құрамына кіретін биологиялық белсенді заттар құрамын анықтау зерттеу жұмысымыздың негізгі мақсаты болып табылады [20].

Өсімдіктердің белсенділік қасиеттері, негізінен химиялық қосылыстардың әр түрлі кластарына жататын биологиялық белсенді заттар құрамы: алкалоидтар, эфир майлары, сапониндер, таниндер, ферменттер, амин қышқылдары, гликозидтер, дәрумендер, эфир майлары және т.б қосылыстарға байланысты. Жекелеген өсімдіктерде әр түрлі мөлшерде химиялық заттардың бірнеше тобы бар. Тіпті өсімдіктердің жекелеген мүшелерінде де, биологиялық белсенді заттардың табиғаты алуан түрлі. Себебі, биологиялық белсенді заттар көптеген емдік қасиеттерге ие. Өсімдіктің белсенді құрамының мөлшері мен әсері өсімдік мүшелеріне, жасына, жиналған уақытына, өсу жағдайына, кептіру және сақтау шарттарына байланысты. Дегенмен, әр түрлі жағдайға байланысты өсімдік құндылығынан және дәрілік қасиеттерінен толықтай жолғалтуы мүмкін [21]. Сондықтан зерттеу жұмысымыздың мақсаты

Алматы облысында кездесетін биологиялық белсенді заттарға бай өсімдіктердің құрамын іріктеу болып табылады.

Зерттеу әдістері мен объектілері

Зерттеу объектісі *Eichhornia crassipes* су өсімдігі арнайы қоректік ортада, (25 – 28°C температурада), жарық бөлмесінде модельді тәжірибе ретінде өсірілді. Тәжірибеге алынған өсімдіктің жер үсті (жапырағы мен сабағы) және жер асты бөлігінен (тамырынан) биологиялық белсенді заттар анықталды. Анализге қажетті өсімдік мөлшері бір классқа 2 грамнан өлшеп алынды. Сапалық анализ жасау үшін өсімдіктердің шөкімдерін 50% сулы ацетонды ерітіндіде және 10% сулы спиртті ерітінділермен 4 сағаттық термиялық (t 70-80°C) өңделді. 10% концентрлі сулы спирттік сығынды және оған 5 есе 95% этанолды қосу арқылы минутына 3000 айналымда центрифугирлеу арқылы полисахаридтер бөлініп тұндырылды. Ерітіндінің беткі қабатындағы сұйықтық қорғасын ацетатының 10% ерітіндісімен өңделіп дубильді қосылыстар тұнбаға түсірілді. Тұнбаны жеке бөліп алып, қалған сығынды құрамынан фенол және аминқышқылдарды анықталды. Алкалоидты заттар Драгендорф реактивінің реакциясымен идентификацияланды (кірпіш – қызыл түске боялды), аминқышқылдар нингидрин реакциясымен идентификацияланды және стандартты үлгілер қағаз хроматография әдісімен анықталды; антрахинондар магний ацетаты (қызыл -күлгін түске боялды) реакциясы арқылы идентификацияланды; белокты анықтау биурет реакциясы көмегімен (көк – күлгін түске боялды) жүргізілді; илік заттар темір – аммонилі (көк түске боялды) реакциясы нәтижесінде анықталды; кумариндер лактонды сынамамен анықталды (ашық сары тұнба түзілді); полисахаридтерді этил спиртінің 4 еселенген көп мөлшерде тұнбаға түсу нәтижесінде анықталды; стероидтар Розенхейма реакциясымен анықталды (сиренді түске боялды); терпеноидтарды анықтау үшін фосфорлы – вольфрам қышқылы қолданылды (қызыл түске боялды); фенолқышқылы diazotirlenген п-нитроантин реакциясымен идентификацияланып, стандартты үлгілер қағаз хроматография әдісімен анықталды; флаваноидтар алюминий хлорид және аммиак реакциясымен (сары түске боялды) анықталды [22].

Сонымен қатар, *Eichhornia crassipes* су өсімдігінен биологиялық белсенді заттар құрамының сандық мөлшері анықталды. Ана-

лизге қажетті өсімдік мөлшері бір классқа 2 грамнан өлшеп алынды.

Eichhornia crassipes су өсімдігінің жер үсті бөлігінен (сабақ, жапырақ) илік заттар, кумариндер, полисахаридтер, фенолқышқылы және флаваноидтардың және жер асты бөлігі (тамырынан) алкалоидтар, антрахинон, белок, илік заттар, полисахаридтердің сандық мөлшері анықталды.

Алкалоидтардың пайыздық мөлшері кері титрлеу, белоктар нингидрин, илік заттар перманганатометрия, полисахаридтер гравиметриялық, кумариндер, флаваноидтар антрахинондар, фенолқышқылдары спектрофотометрикалық әдістер бойынша анықталды [23,24].

Зерттеу нәтижелері және талдау

Eichhornia crassipes су өсімдігінің құрамындағы биологиялық белсенді заттардың сапалық көрсеткіштерін анықтау үшін алкалоидтарды Драгендорф және амин қышқылдарын Нингидрин реактиві, антрахинондарды магний ацетаты, белокты биурет реакциясы, илік заттарды аммонилі реакция, кумариндерді лактонды сынамамен, полисахаридтерді этил спиртінің 4 еселенген көп мөлшерде тұнбаға түсуі, стероидтарды Розенхейм реакциясы, терпеноидтарды фосфорлы – вольфрам қышқылы реакциясы, фенол қышқылдарын diazotirlenген п-нитроантин және флаваноидтарды алюминий хлорид және аммиак реакциясымен анықталды.

1-кестеде көрсетілген нәтиже бойынша өсімдіктің сабақ және жапырақ бөлігінен ең көп кездесетін илік заттар, полисахаридтер, фенол қышқылдары және флаваноидтар анықталды.

Сонымен қатар жер асты бөлігі немесе тамыр құрамынан алкалоидтар, амин қышқылдары, антрахинондар, белок, илік заттар, полисахаридтер, терпендер, фенол қышқылдары және флаваноидтар бар екені белгілі болды. Атап айтар болсақ, өсімдіктің жер үсті бөлігінен стероидты заттар болмады, ал өсімдіктің тамыр құрамынан стероидтардың бар екендігі анықталды. Өсімдіктің жер үсті бөлігінде кумариндер бар екені анықталды, керісінше тамыр құрамынан кумаринді заттардың жоқ екені белгілі болды. Өсімдіктің жалпы құрамындағы ең көп кездесетін биологиялық белсенді зат мөлшері илік заттар және өсімдіктің жер үсті бөлігінде ең көп кездесетін фенол қышқылдары, флаваноидтар, полисахаридтер, жер асты бөлігінде антрахинондарға бай екендігі белгілі болды. Сондықтан тәжірибе барысында өсімдіктің

өсімді мүшелерінде қанша мөлшерде биологиялық белсенді заттардың бар екендігін анықтау үшін сандық анализдер жүргізілді [25].

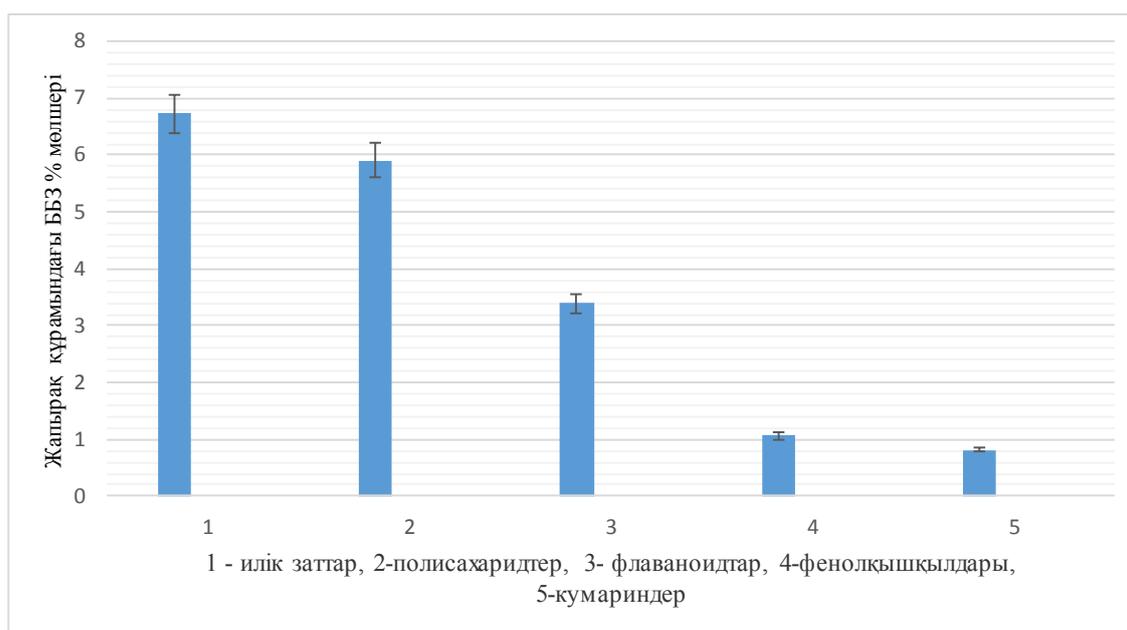
Eichhornia crassipes су өсімдігінің жер үсті бөлігінен (сабақ, жапырақ) илік заттар, кума-

риндер, полисахаридтер, фенолқышқылы және флаваноидтардың және жер асты бөлігі (тамырынан) алкалоидтар, антрахинон, белок, илік заттар, полисахаридтердің сандық мөлшері анықталды.

1-кесте – *Eichhornia crassipes* L су өсімдігінің құрамындағы биологиялық белсенді заттардың сапалық көрсеткіштері

№	Сапалық реакция	Күтілетін нәтижелер	Алынған нәтижелер	
			<i>Eichhornia crassipes</i> (жер үсті бөлігі)	<i>Eichhornia crassipes</i> (тамыр)
Алкалоидтарды идентификациялау				
1	Драгендорф реактивінің реакциясымен идентификацияланды	Кірпіш – қызыл түске боялды	+	+
Амин қышқылдарын идентификациялау				
2	Нингидрин реакциясымен идентификацияланды	Қағаз хроматография әдісінде байқалды	+	+
Антрахинондарды идентификациялау				
3	Магний ацетаты реакциясы арқылы идентификацияланды	Қызыл -күлгін түске боялды	+	++
Белоктарды идентификациялау				
4	Белокты анықтау биурет реакциясымен идентификацияланды	Көк – күлгін түске боялды	+	+
Илік заттарды идентификациялау				
5	Аммонили реакциясы нәтижесінде анықталды	Көк түске боялды	++	++
Кумариндерді идентификациялау				
6	Лактонды сынамамен анықталды	Ашық сары тұнба түзілді	+	-
Полисахаридтерді идентификациялау				
7	Полисахаридтерді этил спиртінің 4 еселенген көп мөлшерде тұнбаға түсу нәтижесінде анықталды	Тұнба түзілді	++	+
Стероидтарды идентификациялау				
8	Розенхейма реакциясымен анықталды	Сиренді түске боялды	-	+
Терпеноидтарды идентификациялау				
9	Фосфорлы – вольфрам қышқылы қолданылды	Қызыл түске боялды	+	+
Фенол қышқылдарын идентификациялау				
10	Диазотирленген п-нитроантин реакциясымен идентификацияланды	Қағаз хроматография әдісінде байқалды	++	+
Флавоноидтарды идентификациялау				
11	Алюминий хлорид және аммиак реакциясымен анықталды	Сары түске боялды	++	+

(Ескерту: «-» құрамындағы заттар жоқ немесе сандық мөлшерін анықтау қажет; «+» құрамында мөлшері белгісіз заттар; «++» құрамындағы заттар өте көп мөлшерде).



1-сурет – *Eichhornia crassipes* су өсімдігінің жер үсті бөлігі биологиялық белсенді заттар (ББЗ) құрамының пайыздық мөлшері

1-суретте келтірілген нәтижелер бойынша *Eichhornia crassipes* өсімдігінің құрамынан ең көп мөлшерде илік заттар анықталды.

Перманганометриялық әдіс көмегімен анықталған өсімдіктің жер үсті бөлігіндегі илік заттардың пайыздық мөлшері 6,73%, гравиметриялық әдіспен анықталған полисахаридтер басқа биологиялық белсенді заттармен салыстырғанда көп мөлшерде екені белгілі болды, яғни оның мөлшері 5,91%. Флаваноидтар, кумариндер, фенол қышқылдары спектрофотометриялық әдіспен анықталды. Өсімдік құрамындағы флаваноидтардың пайызы 3,39 %-ға тең болса, ең аз мөлшерде фенол қышқылдар мен кумариндер. Олардың пайыздық мөлшері фенол қышқылдары 1,06%, кумарин 0,82 % пайыз болды (Музычкина., т.б., 2004:288).

Eichhornia crassipes өсімдігінің құрамындағы биологиялық белсенді заттар мөлшері, соның ішінде илік заттар полисахаридтерден 14%, флаваноидтардан 50% , фенол қышқылынан 84%, кумариндерден 87%-ға жоғары болды.

Өсімдік құрамындағы көлемі бойынша, екінші деңгейдегі биологиялық белсенді заттар мөлшері полисахаридтер, илік заттардан 14 % төмен болса, диаграмма бойынша одан төменгі заттар мөлшерінен 86% -ға дейін жоғары болды, ал ең төменгі мөлшердегі кумариндер басқа заттармен салыстырғанда 87% – ға дейін төмен деңгейде болды.

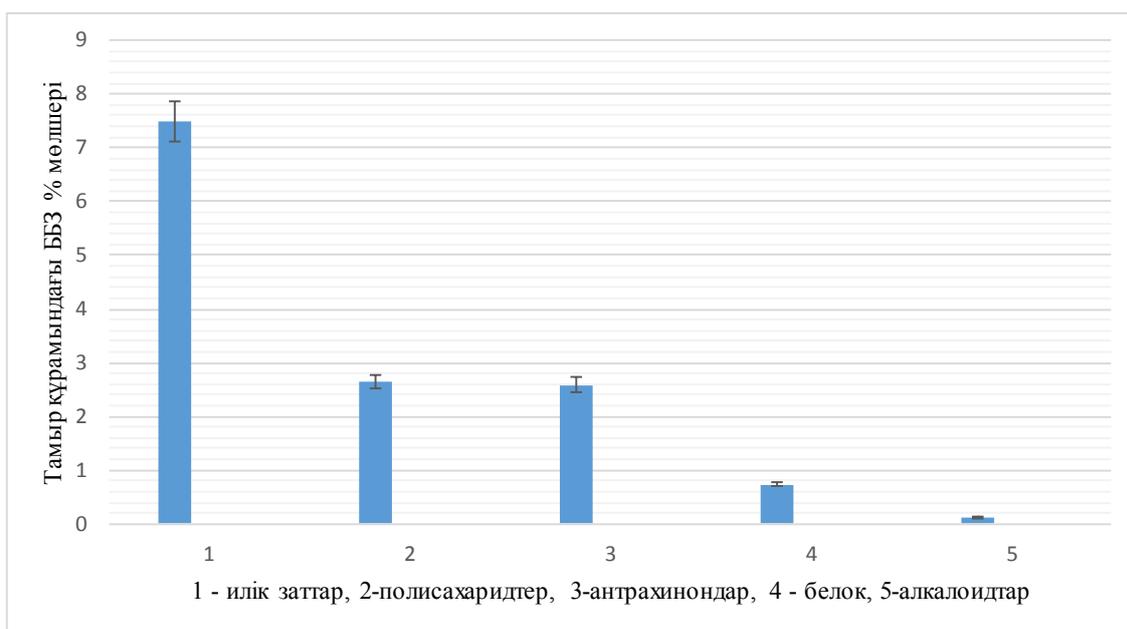
Флаваноидтар мен фенол қышқылдары өсімдік құрамында орташа мөлшерде кездесті яғни, жоғары мөлшердегі заттармен салыстырғанда 50% -ға дейін аз болса, төменгі мөлшердегі заттар құрамымен салыстырғанда 34%-ға дейін жоғары болды.

Өсімдіктің жер үсті бөлігіндегі белсенді заттардың деңгейіне байланысты, оларды әр түрлі медициналық мақсатта қолдану мүмкіндігіне жол ашады. Өсімдік құрамындағы биологиялық белсенді заттар организмнің қызметінің белсенділігін арттырып, иммунитетті жоғарылатады. Мысалы, әр түрлі өсімдік шикізат құрамындағы илік заттар әр түрлі қабынуға қарсы, бактерицидтік және қанды қалпына келтіруші қасиеттерге ие. Белок құрамындағы альбуминдермен тығыз байланыс қалыптастырып, осы ерекшелігіне қарай әр түрлі жараларды емдеу кезінде қабынуды төмендетеді. Мөлшері бойынша екінші деңгейдегі белсенді заттар полисахаридтер. Әр түрлі өсімдіктердегі полисахаридтердің биологиялық белсенділігі туралы зерттеулерде антибиотикалық, ісікке қарсы, усыздандыру, антилипемиялық, антисклеротикалық қасиеттерге ие екендігі анықталған. Өсімдік полисахаридтерінің антилипемиялық, антисклеротикалық ролі белоктар мен липопротеидтердің кешенді өндірілуіне байланысты. Көптеген зерттеулерде өсімдік құрамындағы полисахаридтер вирус аурулары-

на, жарақаттарға, гастритке қарсы белсенділігі анықталған [26].

2-суретте көрсетілгендей тамыр құрамында да ең көп кездесетін биологиялық белсенді илік заттар құрамы перманганометриялық әдіс көмегімен анықталды. Илік заттардың пайыздық мөлшері 7,48%. Илік заттардың жер үсті бөлігі тамыр құрамымен салыстырғанда 10%-ға дейін жоғары болды. Гравиметриялық әдіспен анықталған полисахаридтердің пайыздық мөлшері

2,64%. Өсімдіктің жер үсті бөлігіндегі полисахаридтер жер асты тамыр құрамындағы полисахаридтермен салыстырғанда 48% дейін жоғары болды. Спектрофотометриялық әдіспен анықталған антрахинондар пайыздық мөлшері бойынша 2,59%. Белоктар Нингидрин әдісімен анықталды және пайыздық мөлшері 0,73%. Кері титрлеу әдісімен анықталған алкалоидтардың пайыздық құрамы 0,13% (Музыкакина., т.б., 2004:288).



2-сурет – *Eichhornia crassipes* су өсімдігінің жер асты (тамыр) бөлігіндегі (ББЗ) биологиялық белсенді заттар құрамының пайыздық мөлшері

Тамыр құрамындағы биологиялық белсенді заттар мөлшері де илік заттар антрахинондармен салыстырғанда 80%, полисахаридтермен салыстырғанда 64%, белоктармен салыстырғанда 90%, алкалоидтармен салыстырғанда 98%-ға дейін жоғары болды. Полисахаридтердің мөлшері басқа заттармен салыстырғанда 95 % ға дейін жоғары болды. Тамыр құрамында ең аз мөлшердегі биологиялық белсенді зат құрамы, белоктар мен алкалоидтар 96%- ға дейін төмен болды.

Қорытынды

Eichhornia crassipes су өсімдігінің құрамындағы биологиялық белсенді заттардың сапалық көрсеткіштерін анықтау бойынша амин қышқылдары, антрахинондар, белоктар,

илік заттар, кумариндер, полисахаридтер, стероидтар, терпеноидтар, фенол қышқылдары және флаваноидтар анықталды. Сапалық көрсеткіштер бойынша ең көп кездесетін биологиялық белсенді заттар құрамы бойынша ең көп мөлшерде илік заттар, фенол қышқылдары, флаваноидтар, полисахаридтер анықталды. Өсімдіктің жер үсті бөлігінде илік заттар 6,73%, полисахаридтер 5,91%, флаваноидтар 3,39%, фенол қышқылдары 1,06%, кумариндер 0,82%. Тамыр құрамында да ең көп кездесетін биологиялық белсенді заттар құрамында да ең көп кездесетін илік заттар құрамы. Илік заттардың пайыздық мөлшері 7,48%. Илік заттардың жер үсті бөлігі тамыр құрамымен салыстырғанда 10% – ға дейін жоғары болды. Полисахаридтердің пайыздық мөлшері 2,64%. Өсімдіктің жер үсті бөлігіндегі

полисахаридтер жер асты тамыр құрамындағы полисахаридтермен салыстырғанда 48% дейін жоғары болды. Антрахинондар пайыздық мөлшері бойынша 2,59%, белоктар 0,73%, алкалоидтар құрамы 0,13%.

Ұсынылған әдістердің дәстүрлі әдістерден ерекшелігі өсімдіктегі фенолды қосылыстар, флаваноидтар, кумариндерді этанолды ерітіндіде, ал илік заттар, полисахаридтерді суда, алкалоидтарды аммиак ерітіндісінде, антрахинондар-

ды сілтілі – аммиак ерітіндісінде экстрациялау болып табылады. Бұл әдістер жабайы өсетін, жойылып бара жатқан өсімдіктердің вегетативті мүшелерінен аз уақытта биологиялық белсенді заттар мөлшерін анықтауға мүмкіндік береді. Болашақта бөліп алынған сығындыларды биологиялық белсенді заттар қосындыларын ЖТСХ (Жоғары тиімді сұйық хроматография) әдісімен және басқа да әдістермен анықтау үшін ұсынылады.

Әдебиеттер

- 1 Aboul-Enein A. M. et al. *Eichhornia crassipes* (Mart) solms: from water parasite to potential medicinal remedy // *Plant signaling & behavior*. – 2011. – Vol. 7. – P. 834-836.
- 2 Adams D. C. et al. (2005) Bioeconomic Modeling of the Invasive Aquatic Plants *Hydrilla verticillata* (hydrilla), *Eichhornia crassipes* (water hyacinth), and *Pistia stratiotes* (water lettuce) and their impacts on angler effort on Florida lakes // *Annual meeting*, July. P. 24-27.
- 3 Aravind R. K. et al. Detailed analysis on phytochemicals, antioxidants, antimicrobial activity of *Eichhornia crassipes* // *Inter J Sci Res*. – 2013. – Vol. 2. – P.17-19.
- 4 Baral B., Vaidya G. S. (2011) Biological and chemical assessment of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (mart.) Solms.) of Phewa Lake, Nepal // *Sci World*. – 2011. – Vol. 9. – P. 57-62.
- 5 Dahui Z., Duanwei Y. Research Advances of *Eichhornia crassipes* and It's Utilization [J] // *Journal of Huazhong Agricultural*. – 2005. – Vol. 4. – P. 25
- 6 Dissanayake D., Ranaweera B., Amarasingha A. A. L. Effect of Sex Ratio in *Neochetina bruchi* Adult Population on their Performance for Biological Control of *Eichhornia crassipes* // *Proceedings of 9th Agricultural Research Symposium*. – 2009. – Vol. 368. – P. 372.
- 7 Hiba H. H., Kais Kassim Gh., Ali M. Photochemical, antioxidant and antibacterial activities of some extracts of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) leaves // *International Journal of Advances in Pharmaceutical*. June – 2013. – Vol. 4. – P. 1847 – 1851.
- 8 Hossain M. et al. In-Vitro Determination of Antioxidant Capacity for Methanolic extract of *Eichhornia crassipes*, *Lawsonia inermis* L. and *Cissus quadrangularis* L : – East West University. – 2013. – P. 18-22
- 9 Isebe T. I. Phytochemical Composition And Antibacterial Activity Of *Eichhornia Crassipes* In Lake Victoria, Kisumu // *International Journal of Scientific & Technology Research*. – 2016. – Vol. 4. – P. 45-52.
- 10 Lalitha P., Sripathi S. K., Jayanthi P. Acute toxicity study of extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2012. – Vol. 5. – P. 59-61.
- 11 Lata N. Antioxidants of *Eichhornia crassipes*: The World's Worst Aquatic Weed // *Journal of Medical Biomedical and Applied Sciences*. – 2014. – Vol. – P. 20-24.
- 12 Lata N. et al. Isolation of flavonoids from *Eichhornia crassipes*: the world's worst aquatic plant // *Journal of Pharmacy Research*. – 2011. – Vol. 3. – P. 2116-2118.
- 13 Lata N., Dubey V. Quantification and identification of alkaloids of *Eichhornia crassipes*: the world's worst aquatic plant // *J Phar Res*. – 2011. – Vol. 3. – P. 1229-1231.
- 14 Malar S. et al. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)] // *Botanical studies*. – 2016. – Vol. 3. – P. 54
- 15 Mohanty K. et al. Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by *Eichhornia crassipes* // *Chemical Engineering Journal*. – 2006. – Vol. 117. – P. 71-77.
- 16 Ogamba E. N. et al. Water quality, phytochemistry and proximate constituents of *Eichhornia crassipes* from Kolo creek, Niger Delta, Nigeria // *International Journal of Applied Research and Technology*. – 2015. – Vol. 4. – P. 77-84.
- 17 Shearer J. F. Is classical biocontrol using fungi a viable option for submersed aquatic plant management // *Journal of Aquatic Plant Management*. – 2008. – Vol. 46. – P. 202-205.
- 18 Shu X. et al. Comparative responses of two water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) cultivars to different planting densities // *Aquatic Botany*. – 2015. – Vol. 121. – P.1-8.
- 19 Thamaraiselvi P. et al. Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms // *Asian Journal of Plant Science and Research*. – 2012. – Vol. 2. – P. 115-122.
- 20 Thorat L. J., Nath B. B. Effects of water hyacinth *Eichhornia crassipes* root extracts on midge *Chironomus ramosus* larvae: a preliminary note // *Physiological entomology*. – 2010. – Vol. 35. – P. 391-393.
- 21 Tulika T., Mala A. Pharmaceutical potential of aquatic plant *Pistia stratiotes* (L.) and *Eichhornia crassipes* // *Journal of Plant Sciences*. – 2015. – Vol. 3. – P. 10-18.

- 22 Yernazarova, G., Ramazanova, A., Anuarova, L., Korulkin, D., & Kudaibergenova, B. Method of use of biotechnological research (for example, biologically active substances of higher aquatic plants) in teaching Biology //Journal of Educational Sciences, – 2018. – Vol. 3. – P. 66-73.
- 23 Абдрахимова Й. Р., Валиева А. И. Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты (часть 3. Фенольные соединения): Уч.-метод. пособие, под. ред./Багаевой ТВ—Казань: Казан ский федеральный университет. – 2010. – 29с.
- 24 Валиева Н. Г. Лекарственные растения источники биологически активных веществ /Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана– 2010. – Т. 203. – 128с.
- 25 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Качественный и количественный анализ основных групп БАВ в лекарственном растительном сырье и фитопрепаратах // Монография.- Алматы: Қазақ университеті, 2004. – 288 с.
- 26 Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Методология исследования растительных метаболитов.- Монография.- Алматы: MV-Print, 2012. – 324 с.

References

- 1 Abdrakhimova YU.A. R., Valiyeva A. I. (2010) Vtorichnyye biologicheskkiye metabolity: fiziologicheskkiye i biokhimicheskkiye aspekty (chast' 3. Fenol'nyye soyedineniya): tretiy metod. posobiye, pod red // Bagayeva TV-Kazan': Kazanskiy federal'nyy universitet. P. 29.
- 2 Aboul-Enein A. M. et al. (2011) *Eichhornia crassipes* (Mart) solms: from water parasite to potential medicinal remedy // Plant signaling & behavior. vol. 6. №. 6. pp. 834-836.
- 3 Adams D. C. et al.(2005) Bioeconomic Modeling of the Invasive Aquatic Plants *Hydrilla verticillata* (hydrilla), *Eichhornia crassipes* (water hyacinth), and *Pistia stratiotes* (water lettuce) and their impacts on angler effort on Florida lakes // Annual meeting, July. pp. 24-27.
- 4 Aravind R. K. et al. (2013) Detailed analysis on phytochemicals, antioxidants, antimicrobial activity of *Eichhornia crassipes* //Inter J Sci Res. vol. 2. pp. 17-19.
- 5 Baral B., Vaidya G. S. (2011) Biological and chemical assessment of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (mart.) Solms.) of Phewa Lake, Nepal //Sci World. vol. 9. pp. 57-62.
- 6 Dahui Z., Duanwei Y. (2005) Research Advances of *Eichhornia crassipes* and It's Utilization [J] //Journal of Huazhong Agricultural. vol. 4. pp. 025.
- 7 Dissanayake D., Ranaweera B., Amarasingha A. A. L. (2009) Effect of Sex Ratio in *Neochetina bruchi* Adult Population on their Performance for Biological Control of *Eichhornia crassipes* //Proceedings of 9th Agricultural Research Symposium. vol. 368. pp. 372.
- 8 Hiba H. H., Kais Kassim Gh., Ali M. (2013) Photochemical, antioxidant and antibacterial activities of some extracts of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) leaves// International Journal of Advances in Pharmaceutical. June vol. 4 /Issue. 6 / pp.1847 – 1851.
- 9 Hossain M. et al. (2012) In-Vitro Determination of Antioxidant Capacity for Methanolic extract of *Eichhornia crassipes*, *Lawsonia inermis* L. and *Cissus quadrangularis* L : – East West University. pp. 18-22
- 10 Isebe T. I.(2016) Phytochemical Composition And Antibacterial Activity Of *Eichhornia Crassipes* In Lake Victoria, Kisumu //International Journal of Scientific & Technology Research. vol. 4. №. 8.pp. 45-52.
- 11 Lalitha P., Sripathi S. K., Jayanthi P. (2012) Acute toxicity study of extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms //Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. vol. 5. №. 4. pp. 59-61.
- 12 Lata N. (2014) Antioxidants of *Eichhornia crassipes*: The World's Worst Aquatic Weed //Journal of Medical Biomedical and Applied Sciences. vol. pp.20-24.
- 13 Lata N. et al. (2010) Isolation of flavonoids from *Eichhornia crassipes*: the world's worst aquatic plant //Journal of Pharmacy Research. vol. 3. №. 9. pp. 2116-2118.
- 14 Lata N., Dubey V. (2010) Quantification and identification of alkaloids of *Eichhornia crassipes*: the world's worst aquatic plant //J Phar Res. vol. 3. pp. 1229-1231.
- 15 Malar S. et al. (2016) Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)] //Botanical studies.vol. 55. №. 1. P. 54.
- 16 Mohanty K. et al.(2006) Biosorption of Cr (VI) from aqueous solutions by *Eichhornia crassipes* //Chemical Engineering Journal. vol. 117. №. 1.pp. 71-77.
- 17 Muzychkina R.A., Korulkin D.YU., Abilov ZH.A. (2004) Katchestvennyy i krupnomasshtabnyy analiz osnovnykh grupp lekarstv v farmatsevticheskikh preparatakh // Monografiya. – Алматы: Kazakhskiy universitet. P. 288.
- 18 Muzychkina R.A., Korulkin D.YU., Abilov ZH.A. (2010) Metodologiya issledovaniya rastitel'nykh metabolitov.- Monografiya. – Алматы: MV-Print, P 324 .

- 19 Ogamba E. N. et al. (2015) Water quality, phytochemistry and proximate constituents of *Eichhornia crassipes* from Kolo creek, Niger Delta, Nigeria //International Journal of Applied Research and Technology. vol. 4. №. 9. pp. 77-84.
- 20 Shearer J. F. (2008) Is classical biocontrol using fungi a viable option for submersed aquatic plant management //Journal of Aquatic Plant Management. vol. 46. pp 202-205.
- 21 Shu X. et al.(2015) Comparative responses of two water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) cultivars to different planting densities //Aquatic Botany. vol. 121. pp. 1-8.
- 22 Thamaraiselvi P. et al. (2012) Preliminary studies on phytochemicals and antimicrobial activity of solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms //Asian Journal of Plant Science and Research. vol. 2. №. 2. pp. 115-122.
- 23 Thorat L. J., Nath B. B. (2010) Effects of water hyacinth *Eichhornia crassipes* root extracts on midge *Chironomus ramosus* larvae: a preliminary note //Physiological entomology. vol. 35. – №. 4. pp. 391-393.
- 24 Tulika T., Mala A. (2015) Pharmaceutical potential of aquatic plant *Pistia stratiotes* (L.) and *Eichhornia crassipes* //Journal of Plant Sciences. vol. 3. №. 1-1. pp. 10-18.
- 25 Valiyeva N. G. (2010) Vestnikovyye rasteniya istochnikov biologicheski aktivnykh veshchestv // Uchenyye zapissy Kazanskoy gosudarstvennoy akademii Veterinariya im. N. E. Bauman. – №. 203. P.128.
- 26 Yernazarova, G., Ramazanova, A., Anuarova, L., Korulkin, D., & Kudaibergenova, B. (2018). Method of use of biotechnological research (for example, biologically active substances of higher aquatic plants) in teaching Biology. Journal of Educational Sciences, 55(2),pp. 66-73.

3-бөлім
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 3
BIOTECHNOLOGY

Раздел 3
БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Олжаев Ф.С.¹, Сафарова (Янцен) Ю.И.², Цой А.К.³,
Умбаев Б.А.⁴, Аскарова Ш.Н.⁵**

¹e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

²e-mail: yantsen@nu.edu.kz

³e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

⁴e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

⁵e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ
ОСТЕОФИЛЬНОГО БИСФОСФОНАТНОГО ПОЛИМЕРА
НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ, ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ
АДИПОЗНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СПОСОБНОСТИ ИНГИБИРОВАТЬ
АКТИВНОСТЬ ОСТЕОКЛАСТОВ *IN VITRO***

Остеопороз – это прогрессирующее системное заболевание, характеризующееся снижением костной массы и нарушением микроархитектоники костной ткани, приводящее к увеличению хрупкости кости и высокому риску возникновения переломов. Регресс плотности и прочности костной ткани при остеопорозе обусловлен усилением функциональной активности остеокластов и снижением количества клеток-предшественников остеобластов и развитием так называемой «остеогенной недостаточности». Нами разрабатывается новый способ клеточной терапии адипозными мезенхимальными стволовыми клетками (AT-MSCs), функционализированными синтетическим остеофильным бисфосфонатным полимером с целью восполнения популяции прогениторных клеток остеогенеза и ингибирования остеокластной активности в очаге замедленного сращения кости при остеопороз-ассоциированных переломах. В настоящей статье отражены данные по синтезу остеофильного полимера, выделению гомогенной клеточной культуры AT-MSCs с оценкой чистоты полученной клеточной популяции, исследованию влияния полимера на пролиферацию и остеогенную дифференцировку AT-MSCs и изучение его способности ингибировать активность остеокластов *in vitro*. Согласно полученным данным, полимер не является цитотоксичным, не оказывает влияния на пролиферативную активность и остеогенную дифференцировку AT-MSCs, однако существенно ингибирует фагоцитарную активность макрофагов костного мозга. По результатам исследований AT-MSCs, функционализированные остеофильным полимером могут быть использованы при дальнейших экспериментах на лабораторных животных для оценки эффективности предлагаемого метода стимуляции репаративного остеогенеза *in vivo* с использованием животной модели остеопороза с созданием остеопороз-ассоциированных переломов трубчатых костей.

Ключевые слова: остеопороз, остеокласты, репаративный остеогенез, адипозные мезенхимальные стволовые клетки, остеофильный полимер, клеточная терапия.

Olzhaev F.S.¹, Safarova (Jancen) Ju.I.², Tsoy A.K.³,
Umbaev B.A.⁴, Askarova Sh.N.⁵

¹e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

²e-mail: yantsen@nu.edu.kz

³e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

⁴e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

⁵e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, JSC "Nazarbayev University, Kazakhstan, Astana

Cell therapy approach for correction of osteoporosis-associated fractures using adipose-derived mesenchymal stem cells functionalized with osteophilic polymer

Osteoporosis is a progressive systemic skeletal disease characterized by reduced bone density and disrupted microarchitecture of the bone tissue that leads to increased bone fragility and elevated risk of bone fractures. In osteoporotic condition decrease in bone density and strength happens not only due to the increased osteoclastic activity but also due to the decreased number of osteoblast cells precursors (mesenchymal stem cells) and development of so called "osteogenic insufficiency". We proposed the new method of cell therapy with adipose derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs) and surface modification with synthetic bisphosphonate osteophilic polymer that would restore the osteoblast progenitor pool and at the same time inhibit osteoclastic activity in the regeneration zone of osteoporosis associated fractures. In current paper we have outlined the process of osteophilic polymer synthesis, isolation of homogenic population of AT-MSCs and assessment of the purity of obtained cell populations, assessment of polymer effect on cell proliferation and subsequent differentiation down the osteogenic lineage and polymer effect on the osteoclastic activity in vitro. According to the obtained data polymer was not found to be cytotoxic and did not affect the speed of MSCs proliferation. Surface modification with the polymer has no effect on cell osteogenic differentiation however inhibits phagocytic activity of bone marrow derived macrophages. Polymer functionalized MSCs could be subsequently used in further animal studies to assess the efficacy of suggested approach for stimulation of regenerative processes in vivo using the animal model of osteoporosis and osteoporosis associated fractures of compact bones.

Key words: osteoporosis, osteoclasts, reparative osteogenesis, adipose mesenchymal stem cells, osteophilic polymer, cell therapy.

Олжаев Ф.С.¹, Сафарова (Янцен) Ю.И.², Цой А.К.³,
Умбаев Б.А.⁴, Аскарова Ш.Н.⁵

¹e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

²e-mail: yantsen@nu.edu.kz

³e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

⁴e-mail: bauyrzhan.umbayev@nu.edu.kz

⁵e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Қазақстан, Астана қ.

Остеопорозбен байланысқан сүйек сынуды түзетуде остеофильді полимермен өңделген адипозды мезенхимальді бағаналы жасушалармен жасушалық терапия әдісін қолдану

Остеопороз – бұл сүйек массасының төмендеуімен және сүйектің микроархитектоникасының бұзылуымен сипатталатын, сүйек зақымдалуының жоғарылауына және сынудың жоғары тәуекеліне әкелетін прогрессивті жүйелі ауру. Остеопороздағы сүйек тығыздығының және беріктігінің регрессі остеокласттардың функционалдық белсенділігінің артуымен ғана емес, остеобласттардың прекурсорлық жасушаларының санының азаюымен және «остеогендік жеткіліксіздіктің» дамуымен байланысты. Остеопорозбен байланысты сынықтар кезінде сынған сүйектің баяу бітіп кетуі орталығында остеогенездің прогениторлық жасушалар популяциясын және остеокластикалық белсенділікті тежеу үшін синтетикалық остеофильді бисфосфонат полимерімен функционалданған адипозді мезенхимальды бағаналы жасушалармен жасушалық терапияның жаңа әдісін ұсындық. Бұл мақалада остеофильді полимердің синтезі, МҰ-МБЖ біртекті жасуша мәдениетін алу, алынған жасуша популяциясының тазалығын бағалау, МҰ-МБЖ-дің пролиферациясы мен остеогендік дифференциациясы бойынша полимердің әсерін зерттеу және оның остеокласттық белсенділігін in vitro жағдайында емдеу қабілетін зерттеу туралы мәліметтер келтірілген. Алынған мәліметтерге сәйкес, полимер цитотоксикалық емес, МҰ-МБЖ in vitro пролиферация жылдамдығына әсер етпейді, ал полимердің МҰ-МБЖ-ны полимермен модификациясы олардың остеогендік дифференциалау процестеріне әсер етпейді, сонымен бірге сүйек кемегінің макрофагтарының фагоцитарлық белсенділігін төмендетеді. Зерттеу

нәтижелері бойынша остеофильді полимермен функционалданған МҰ-МБЖ-лар зертханалық жануарларда остеопорозбен байланысты түтікшелі сүйек сынықтарына негізделген жануарлар үлгісін қолдану арқылы *in vivo* жағдайында репаративті остеогенезді ынталандырудың тиімділігін бағалау үшін эксперименттерде ұсынылатын әдіс қолданыла алады.

Түйін сөздер: остеопороз, остеокластар, репаративті остеогенез, адипозді бағаналы жасушалар, остеофильді полимер, жасушалық терапия.

Введение

По данным ВОЗ остеопороз наряду с сахарным диабетом, сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями занимает четвертое место в мире в структуре заболеваний [1, 2]. Международная Организация по вопросам остеопороза приводит сведения о том, что в мире данным заболеванием страдают около 200 миллионов женщин (<https://www.iofbonehealth.org>). Количество страдающих остеопорозом в Республике Казахстан составляет 12,50% женщин и 9,09% мужчин. В мире отмечается нарастающая динамика прогрессивного роста количества пациентов, страдающих остеопорозом, которая к началу 2050 года составит цифры трехкратного прироста числа больных и увеличением частоты остеопороз-ассоциированных переломов [3]. Согласно прогнозу экспертов, число больных в мире с переломами шейки бедра, вследствие остеопороза к 2025 году составит порядка 2.6 млн. человек, а летальность после ОАП возрастет до 700 тысяч случаев в год [1, 4]. На текущий момент в странах OECD финансовые потери, связанные с лечением и последующей реабилитацией пациентов с ОАП являются одной из превалирующих статей расходов в здравоохранении [4].

Остеопения или прогрессивное уменьшение плотности костей при остеопорозе происходит в результате нарастания резорбции кости остеокластами в процессе костного метаболизма, возрастного регресса клеток-предшественников остеобластов и сниженной абсорбции кальция. Преобладающее число научных изысканий в мире направлено на совершенствование методов терапии остеопороза с целью сохранения исходного уровня костной массы, и как следствие, приводящее к снижению риска возникновения переломов. Тем не менее, многие процессы регенерации костной ткани при переломе на фоне остеопороза до сих пор остаются «белыми пятнами», в сравнении с исследованиями, посвященными профилактике остеопороз-ассоциированных переломов [5].

В настоящее время в мире существует несколько методов фармацевтической коррекции

остеопороза, но наиболее распространенными являются лекарственная терапия для стимуляции остеогенеза на основе бисфосфонатных соединений [6-8]. Бисфосфонаты – это аналоги пирофосфатов ($H_2O_3P-O-PO_3H_2$), отличающиеся тем, что центральная гидролитически лабильная P-O-P связь заменена на гидролизоустойчивую P-C-P группу. Механизм действия бисфосфонатных соединений заключается в селективном взаимодействии с гидроксипатитными группами на резорбтивной поверхности костной ткани и снижении скорости метаболизма и функциональной активности остеокластов, за счет ингибирования ключевого фермента в метаболизме остеокластов – FPP (farnesyl pyrophosphates) [9]. Большинство бисфосфонатных средств на рынке представлены соединениями золендроновой кислоты, алендроновой, памидроновой, ризедроновой, ибандроновой и др.

С другой стороны, регресс плотности и прочности костной ткани при остеопорозе обусловлен не только усилением функциональной активности остеокластов, но также и уменьшением количества прогениторных клеток остеогенеза. В этой связи, еще одним перспективным вектором в лечении осложненных переломов является клеточная терапия мезенхимальными стволовыми клетками (mesenchymal stem cells (MSCs)), которые считаются прогениторными клетками остеогенеза [10-23]. Хотя сведения о клиническом применении MSCs при остеопорозе пока не опубликованы, имеются исследования об использовании MSCs для лечения костных дефектов – системных [24] или локальных [18, 25]. Так, например, Horwitz et al показали улучшение регенерации костной ткани при врожденном несовершенном остеогенезе. Аутологичные MSCs вводили пациентам внутривенно, и спустя три месяца было отмечено значительное увеличение минеральной плотности костей по сравнению с контрольной группой [26]. В исследованиях Gangji et al аутологичные клетки костного мозга применяли для лечения асептического остеонекроза головки бедра. Предполагаемый механизм действия клеток связан со стимуляцией остеогенеза за счёт «свежей» стромальной фракции и ангиогенеза.

неза за счёт CD34(+)-клеток в, так называемых, «мёртвых зонах» кости [27].

Различают два основных источника получения стромальной фракции – это аспират костного мозга подвздошной кости и аспират жировой ткани. В силу физиологического расположения, аспират костного мозга содержит в себе большее количество MSCs по сравнению с аспирированием жировой ткани, и в основной массе опубликованных трудов средоточие исследований сфокусировано на MSCs, выделяемых из костного мозга. [10-22]. Однако, принимая во внимание степень инвазивности и сложности, связанные с получением MSCs из костного мозга в клинической медицине, в последнее время более пристальное внимание ученых привлекают технологии использования MSCs, выделенных из жировой ткани (AT-MSCs), ввиду возможности получения их в большом количестве с минимальным риском для пациента [28].

Стромально-васкулярная фракция жировой ткани, содержащая различные популяции стволовых клеток-предшественниц, может быть легко выделена ферментативным способом и использована при различных патологических состояниях. Тем не менее, одним из недостатков трансплантации стромальной фракции, полученной из аспирированной жировой ткани, является тот факт, что получаемый клеточный материал является гетерогенным по природе. В связи с тем, что для регенерации костной ткани необходимо преимущественно наличие популяции MSCs, сортировка и пролиферация в условиях *in vitro* мезенхимальных стволовых клеток, входящих в состав стромальной фракции жировой ткани, является необходимым этапом в подготовке клеточного материала для трансплантации.

Несомненно важен и способ трансплантации увеличенных и/или модифицированных *in vitro* MSCs. Внутривенное введение считается наименее инвазивным, но в случае регенерации костной ткани большое количество исследовательских работ показало низкую эффективность хоуминга MSCs непосредственно к костной ткани [29]. Основная масса клеток в первые дни аккумуляровалась в легких [30-32]. По прошествии 7-10 дней все-таки наблюдалась миграция клеток к очагам воспаления, однако процент этих клеток составил лишь 3,5% от общей массы [33]. Кроме того, в случае внутривенного введения стоит соблюдать ряд предосторожностей в диагностическом плане, так как согласно исследованиям Kidd et al [34] **трансплантируемые вну-**

тривенно MSCs имеют также тропность к очагам развития опухолей, таких как рак груди или рак яичника. С этой точки зрения, локальное введение клеточного материала является клинически наиболее эффективным и безопасным, так как трансплантат попадает непосредственно в очаг поражения. Тем не менее, в некоторых исследованиях ставится под сомнение способность к выживанию клеток ввиду отсутствия кислорода и питательных веществ вдали от кровотока [35]. Применение методов поверхностной модификации в данном случае может улучшить механизм хоуминга, а также, в зависимости от функциональной активности лиганды, иметь и сочетанный эффект.

Поверхностная модификация клеточной мембраны может улучшить эффективность хоуминга за счет лигандов, имеющих высокую аффинность к костной ткани. В исследованиях Guan et al и Yao et al была разработана полимерная конструкция LLP2A-Ale, которая посредством лиганды LLP2A связывалась с поверхностью клеточной мембраны, а таргетная доставка к костной ткани обеспечивалась за счет высокой аффинности аллендроната к костной ткани [36, 37]. Работа американских ученых Sarkar et al основана на модификации клеточной мембраны с помощью рецептора sialyl Lewis X (SLeX), который улучшает ролинг и хоуминг к клеткам с увеличенной экспрессией Р-селектинов, ответственных за воспалительный процесс [35].

Применяемый в нашем исследовании остеофильный полимер имеет в своем составе две функциональные группы – бисфосфонатную и гидроксисукцимидную (NHS) [38]. Ранее нами было показано, что NHS-группа способна ковалентно связываться с аминными и карбоксильными группами, находящимися на поверхности клеточных мембран, и обеспечивает взаимодействие полимера с мезенхимальными стволовыми клетками (рисунок 1). В свою очередь, бисфосфонаты, имеющие высокую степень сродства к гидроксиапатитам, составляющим почти 2/3 сухой массы кости, с одной стороны призваны обеспечивать аффинность функционализированных полимером клеток к костной ткани, и с другой стороны ингибировать фагоцитарную активность остеокластов.

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилось изучение влияния полимера на пролиферацию и остеогенную дифференцировку стволовых клеток жировой ткани и изучение его способности ингибировать активность остеокластов *in vitro*.

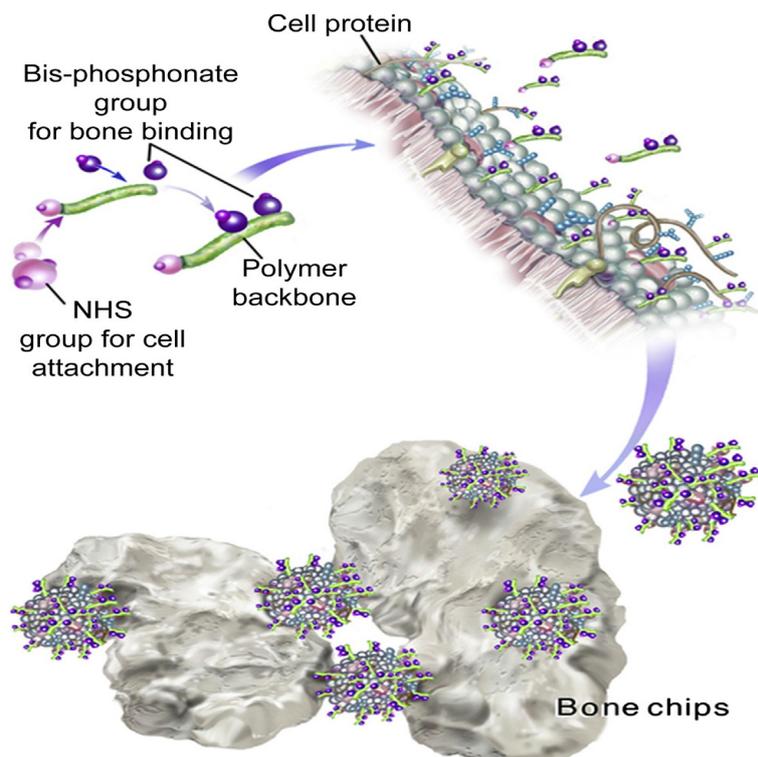


Рисунок 1 – Целенаправленная доставка клеток к кости. Мультифункциональный полимер содержит N-гидроксисукцимид (розовый) и педантную бисфосфонатную группу (сиреневый). N-гидроксисукцимид ковалентно связывается с компонентами клеточной мембраны, а бисфосфонатная группа селективно связывается с гидроксиапатитами на резорбтивной поверхности костной ткани. (D'Souza et al., 2014)

Материалы и методы

Синтез полимера

Полимер был синтезирован методом радикальной полимеризации с переносом атома (ATRP), согласно опубликованному ранее протоколу [38]. Базовой молекулой при синтезе являлся кополимер, состоящий из двух мономеров – биологически инертного N,N-диметилакриламида (DMAA) и N'-гидроксисукцимидного эфира N-акрилоил-6-аминогексановой кислоты (NHS), с последующей полимеризацией и ковалентным присоединением бисфосфонатной группы. Характеризацию синтезируемого полимера проводили с использованием методов гель-хроматографии (GPC) для определения молекулярной длины полимера и ядерно-магнитного резонанса (NMR) для определения концентрации бисфосфонатов.

Выделение и культивирование AT-MSCs из адипозной ткани мелких грызунов (крыс), подтверждение их мезенхимальной природы.

AT-MSCs крыс были получены из адипозной ткани животных согласно опубликованному ранее протоколу [39] с небольшими модификациями. Коротко, жировая ткань была выделена из крыс под ингаляционной анестезией изофлураном в асептических условиях. Образцы промывались в охлажденном DMEM, измельчались, инкубировались с 0.2% раствором коллагеназы и центрифугировались при 300xg на протяжении 5 минут. Осадок ресуспендировали в растворе полной питательной среды (DMEM + 15% FBS + 1% Пенициллин/Стрептомицин) и инкубировали в 75 см² культуральных плашках при стандартных условиях (5% CO₂, 37°C). Для удаления неадгезивных клеток планшеты трехкратно промывали раствором PBS на следующий день, культуральную среду меняли каждые 48 часов на протяжении 3 недель.

Подтверждение мезенхимальной природы выделенных клеток.

По прошествии 21 дня культивирования клетки, экспрессирующие на своей поверхности

маркер CD105, были отсортированы с помощью магнитно-активируемого клеточного сортера. Выделенные CD105-положительные клетки были культивированы до 4-5 пассажей. Мезенхимальная природа выделенных клеток была идентифицирована с помощью иммунофлуоресцентной окраски на маркеры CD90, CD105, CD34, CD45 и CD31. Микроскопический анализ, в том числе и флуоресцентный, был выполнен с использованием микроскопов Olympus IX83 и Carl Zeiss Cell Observer Z1. Изображения были получены с помощью охлаждаемой CCD камеры и программного обеспечения MetaVue.

Функционализация AT-MSCs остеофильным полимером

AT-MSCs были инкубированы вместе с полимером в концентрации 1 мг/мл на протяжении 10 минут в водяной бане при температуре 37°C в 1 мл PBS при pH 8.0. После инкубации взвесь клеток AT-MSCs центрифугировали при 300g в течение 5 минут и промывали в PBS при pH 7.4; процедуру повторяли трехкратно.

Оценка влияния полимера на клеточную пролиферацию

AT-MSCs, функционализированные полимером были высеваны в 96-ти луночные планшеты и инкубированы на протяжении 0, 1, 2, 4, 24, 48 и 72 часов при температуре 37°C, 5% CO₂. Для оценки цитотоксичности полимера и его влияния на рост клеток был использован тест Cell-Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA) согласно протоколу производителя. Оценку количества люминесценции проводили с использованием микроплашечного ридера Biotek Hybrid Reader (Biotek, USA).

Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференциации AT-MSCs

AT-MSCs (1.0±1e6/мл) инкубировали с 1 мг/мл полимера на протяжении 10 минут и промывали трехкратно. Затем клетки высевали в 24-х луночные планшеты и инкубировали в полной питательной среде DMEM на протяжении 12 часов. Затем производили замену среды на готовую остеогенную среду (StemPro Osteogenesis Differentiation Kit, Invitrogen) и культивировали на протяжении 14 суток. Замену остеогенной среды производили каждые 48-72 часов. В качестве контроля применяли мезенхимальные клетки, не модифицированные полимером, но подвергшиеся тем же процедурам, и MSCs, культивировавшиеся в простой питательной среде DMEM. Спустя 14 дней клетки фиксировали в 4%-ном формалине и окрашивали 40 mM алазаринового красного, промывали в PBS и фотографировали

в проходящем свете под прямым микроскопом Carl Zeiss Cell Observer SD.

Дополнительно, остеогенная дифференцировка оценивалась количественно. Кратко, после фиксации МСК в формалине и окрашивания ализариновым красным, клетки инкубировали в 10%-ной ацетиловой кислоте и собирали с использованием клеточного скрабера в микроцентрифужные пробирки. После центрифугирования супернатант был перенесен в новые пробирки, и для нейтрализации ацетиловой кислоты в пробирки добавлялся 10%-ный гидроксид аммония. Концентрация алазаринового красного измерялась на приборе Synergy Hybrid H1 Microplate Reader при длине волны 405 нм.

Оценка влияния полимера на остеокластную активность

Остеокласты выделяли из костного мозга трубчатых костей новорожденных крыс (1-3 дня от рождения) согласно протоколу Tevlin et al[40]. Кратко, животных умерщвляли с помощью CO₂. Кости очищали от мягких тканей в асептических условиях, затем в FACS растворе (PBS+10%FBS) измельчали в ступке, полученную суспензию фильтровали через клеточный фильтр с пропускной способностью 100 микрон. Далее клетки центрифугировали на протяжении 5 минут при 200xg при 4 °C. В полученную клеточную взвесь добавляли 10мл раствора FACS. Отдельно в 50 мл пробирку добавляли 10 мл коммерческого раствора для градиентной клеточной сепарации Histopaque (Sigma Aldrich), туда же сверху осторожно добавляли раствор FACS с клетками и центрифугировали при 200xg на протяжении 15 минут. Осторожно аспирировали средний мутный слой, который содержит необходимые для культивации клетки. Затем повторно промывали в растворе FACS при 200xg на протяжении 5 минут. Затем добавляли среду для индукции роста макрофагов (MEM, 1% Глутамат, 10% ФБС, 1% Пен/Стреп, 50µл M-CSF (10ng/ml, SigmaAldrich)). Клетки высевали в 24-х луночный остеопланшет с покрытием, имитирующим костную ткань (OsteoPlate, Corning). Культивировали в CO₂ инкубаторе при 37°C. На протяжении первых 3 дней среду не меняли. Затем производили смену среды на дифференцировочную (MEM, 1% Глутамат, 10% ФБС, 1% Пен/Стреп, 50µл M-CSF (10ng/ml, SigmaAldrich), 50µл RANKL (10ng/ml, SigmaAldrich)) на ежедневной основе на протяжении 5 дней. Через 5 дней добавляли исследуемые концентрации остеофильного полимера (0,5мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл) и референтного вещества алендроната (в концентрации

4e-3 и 2e-3 г/мл) [41]. Клетки культивировали на протяжении 5 дней, затем часть окрашивали на активность TRAP согласно протоколу производителя (Sigma Aldrich), а часть использовали для оценки остеокластной активности методом Pit Assay. Поверхность лунок оценивали под микроскопом, количественный анализ проводили с помощью программного обеспечения FIJI.

Статистический анализ

Полученные данные представлены в виде средней \pm стандартная погрешность средней величины (Mean \pm SEM). Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Значения

считались достоверно различными при $p \leq 0.05$. Анализ проводился с использованием статистической программы SigmaPlot.

Результаты исследований и их обсуждение

Подтверждение мезенхимальной природы AT-MSCs, выделенных из адипозной ткани крыс.

Свежеизолированная стромальная фракция жировой ткани крыс была представлена гетерогенной клеточной популяцией и позитивно окрашивалась на маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45), эндотелиальных клеток (CD31) и мезенхимальных стволовых клеток (CD105 и CD90) (рисунок 2)

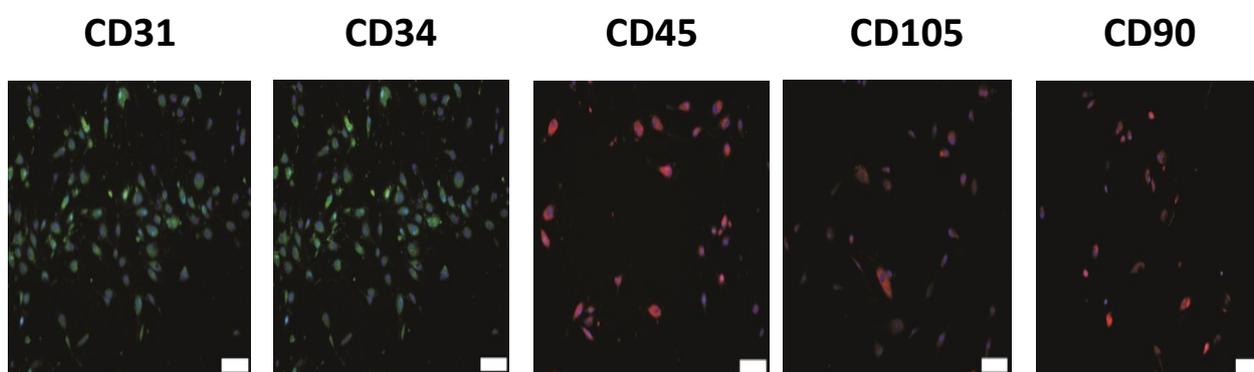


Рисунок 2 – Результаты флуоресцентного окрашивания гетерогенной популяции клеток стромальной фракции жировой ткани крыс на поверхностные маркеры:

ядра клеток были окрашены красителем DAPI (синий канал), гемопоэтических клеток – CD31(зеленый канал, флюорофор Alexa 488), CD45 (красный канал, флюорофор Alexa 594), эндотелиальных клеток – CD34 (зеленый канал, флюорофор Alexa 488), мезенхимальных стволовых клеток – CD105 и CD90 (красный канал, флюорофор Alexa 594). Обх10. (Флуоресцентный микроскоп, Carl Zeiss Cell Observer Z1)

По прошествии 21 дня культивирования клетки, экспрессирующие на своей поверхности маркер CD105, были отсортированы с помощью магнитно-активируемого клеточного сортера. Выделенные CD105-положительные клетки были культивированы до 4-5 пассажей. Была получена популяция AT-MSCs с конфлюэнтностью 80-90%. Клетки имели фибробласт-подобную морфологию и адгезировались к пластику (рисунок 3).

Для дальнейшего подтверждения их мезенхимальной природы было проведено окрашивание на поверхностные маркеры, специфичные именно для AT-MSCs, такие как CD105 и CD90 (рисунок 4). Визуальная оценка представленных микрофотографий подтверждает наличие мар-

керов CD105 и CD90 и отсутствие CD31, CD34, CD45, что является характерным для мезенхимальной популяции. Также был проведен количественный анализ полученной популяции, и согласно результатам, представленным на рисунке 5, выделенные клетки практически гомогенны по своей природе, так как процент клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45) и эндотелиальных клеток (CD31) был меньше 3%.

Изучение влияния остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию AT-MSCs, выделенных из жировой ткани крыс.

Оценка цитотоксичности остеофильного полимера проводилась при помощи теста Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, USA).

На рисунке 6 представлены данные по интенсивности АТФ-индуцированной люминесценции клеток, инкубированных с 1 мг/мл полимера на протяжении 0-72 часов. Согласно полученным данным достоверной разницы между степенью

пролиферации контрольных АТ-MSCs и клеток, обработанных полимером, не наблюдалось, что свидетельствует о том, что полимер не оказывает выраженного токсического эффекта на культуры АТ-MSCs *in vitro*.

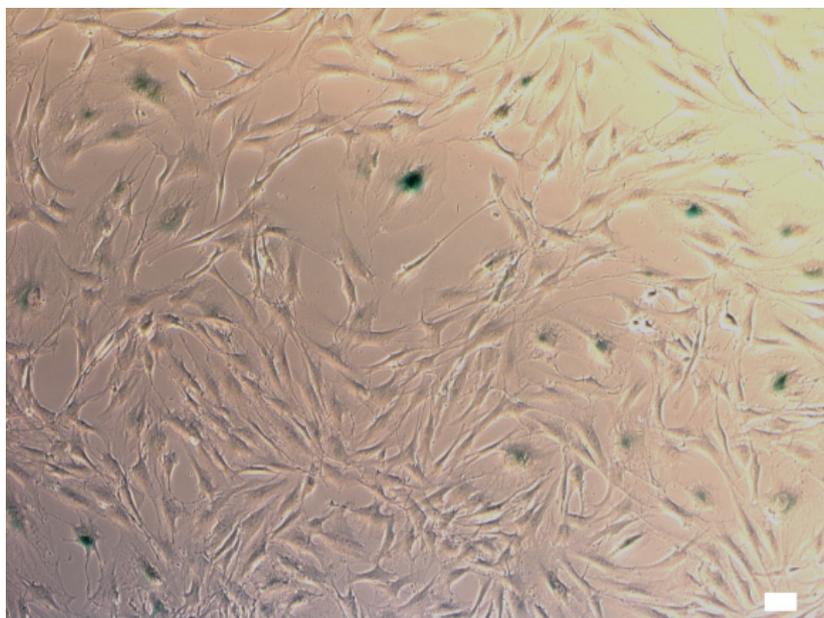


Рисунок 3 – Культура CD105-положительных АТ- МСК на 21 день культивации. Обх10. (Фазово-контрастные снимки, Carl Zeiss Cell Observer Z1)

CD31

CD34

CD45

CD105

CD90

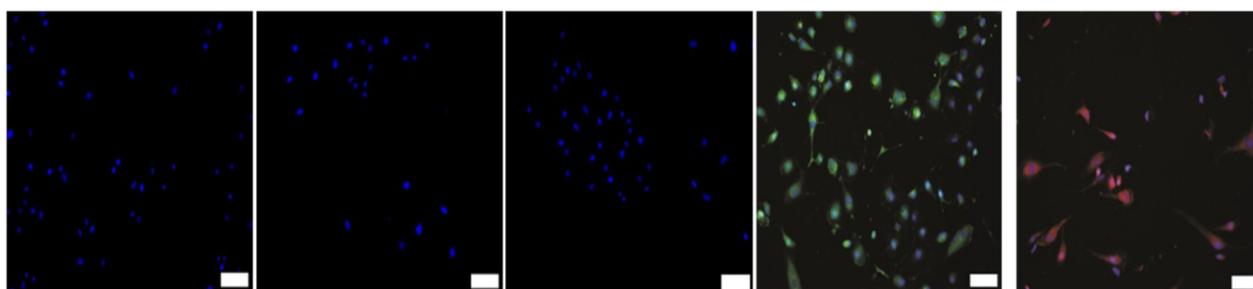


Рисунок 4 – Результаты окрашивания отсортированных клеток на отрицательные поверхностные маркеры: гемопоэтических клеток – CD31(зеленый канал, флюорофор Alexa 488), CD45, эндотелиальных клеток – CD34 (зеленый канал, флюорофор Alexa 488), ядра клеток были окрашены красителем DAPI (синий канал); и положительные поверхностные маркеры мезенхимальных стволовых клеток – CD105(зеленый канал, флюорофор Alexa 488), и CD90 (красный канал, флюорофор Alexa 594). (Флуоресцентный микроскоп, Carl Zeiss Cell Observer Z1)

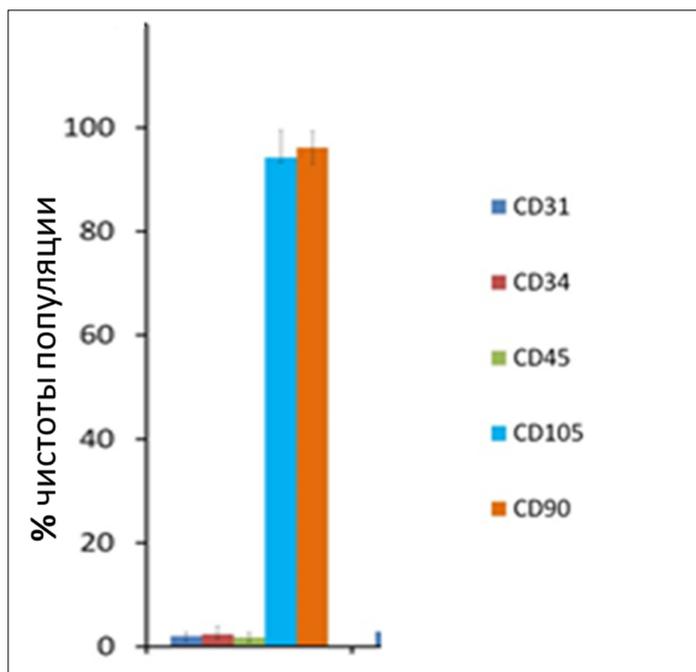


Рисунок 5 – Количественный анализ отсортированных клеток, экспрессирующих маркеры гемопоэтических клеток (CD34 и CD45), эндотелиальных клеток (CD31) и мезенхимальных стволовых клеток (CD105 и CD90) ($p \leq 0.001$, one-way ANOVA)

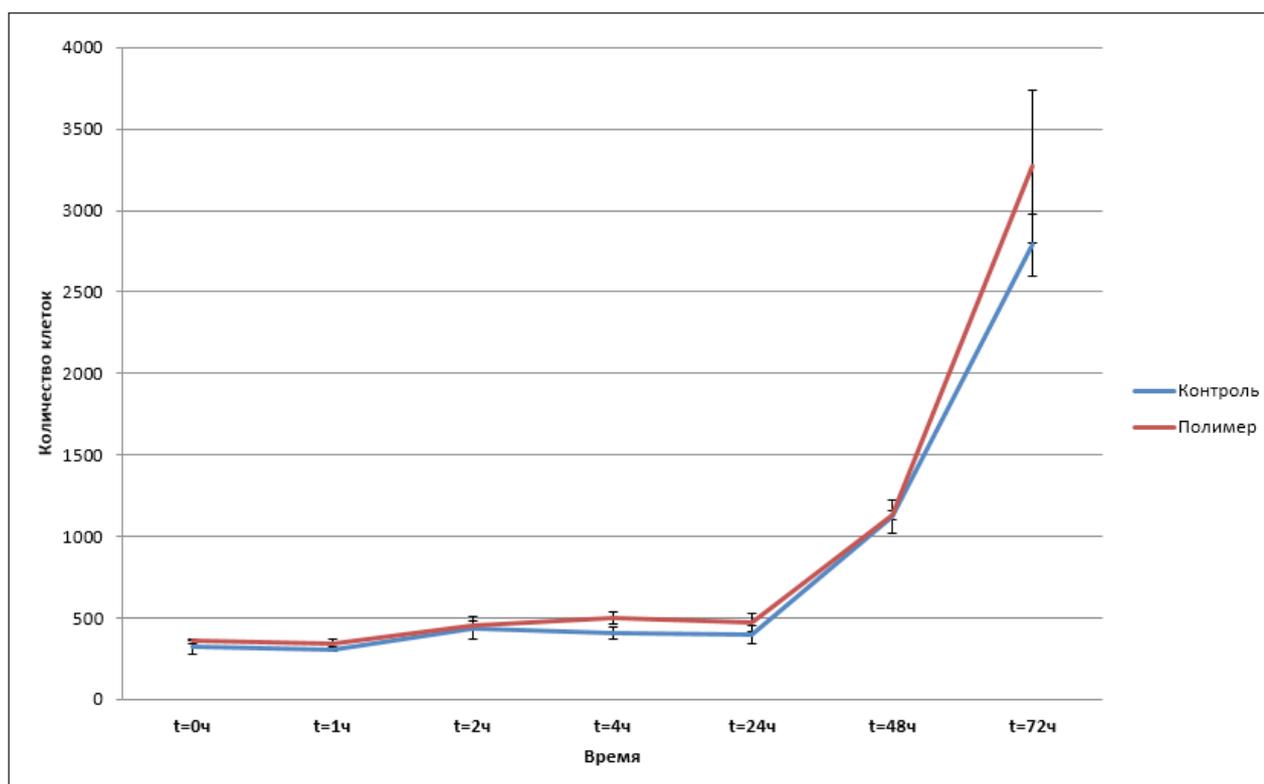


Рисунок 6 – Оценка токсичности полимера на пролиферацию АТ-МСК *in vitro*

Изучение влияния полимера на остеогенную дифференцировку AT-MSCs *in vitro*.

Микроскопический визуальный анализ препаратов, окрашенных алазариновым красным, выявил наличие участков с высокой концентрацией кальция, окрашенные в ярко красный цвет, что свидетельствовало о процессах остеогенной дифференциации (рисунок 7-А, 7-В). Окрашивание клеток алазариновым красным показало, что культивирование мезенхимальных стволовых клеток в остеогенной среде на протяжении 14 дней приводит к индукции их остеогенной дифференциации (рисунок 7-А). В то же самое время, инкубирование клеток с полимером в концентрации 1 мг/мл на протяжении 10 минут

в водяной бане 37°C в 1 мл PBS при pH 8.0 не оказывало влияния на интенсивность окрашивания алазариновым красным (рисунок 7-В), из чего можно сделать вывод о том, что полимер не влияет на процессы остеогенной дифференцировки MSCs и данные клетки могут быть использованы для дальнейших экспериментах на лабораторных животных. В качестве контроля, на микрофотографиях MSCs, культивированных в простой питательной среде DMEM и не подвергавшихся остеогенной дифференцировке, не наблюдалось очагов красного окрашивания (рисунок 7-С). Результаты визуальных наблюдений были подтверждены количественным гистохимическим анализом (рисунок 7-Д).

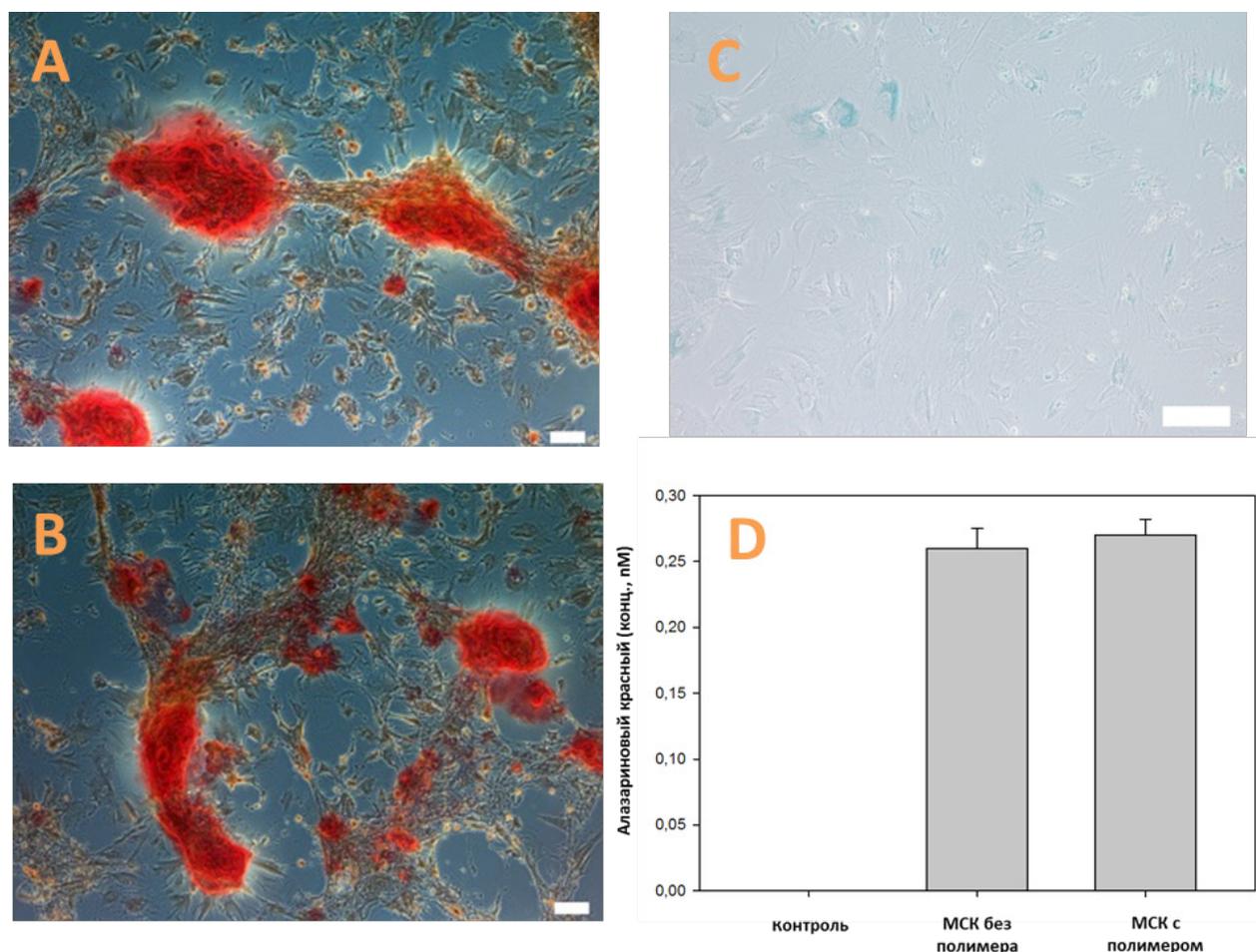


Рисунок 7 – Оценка влияния полимера на процессы остеогенной дифференциации AT-MSCs. Культура AT-МСК (А) и культура AT-МСК, модифицированных остеофильным полимером (В), были дифференцированы с помощью остеогенной среды (OsteoMedia, Gibco) и окрашены Алазариновым Красным (Alizarin Red, SigmaAldrich). Контрольные AT-МСК (С) без дифференцировочной среды не окрасились Алазариновым Красным. Клеточные лизаты были проанализированы с помощью планшетного ридера Synergy Hybrid Reader (Biotek, USA) с длиной волны 405nm (D)

Оценка влияния остеофильного полимера на остеокластную активность

Остеокластная природа выделенных клеток была подтверждена с помощью окраски на активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы (TRAP), высокая активность которой присуща макрофагам и остеокластам. Остеокласты по своей природе происходят от гемопоэтической линии, что и обуславливает их схожесть с макрофагами. Еще одной характерной особенностью остеокластов является наличие большо-

го количества ядер от 10-40 до 100. На Рисунке 8 представлены фотографии полученной культуры остеокластов, клетки имеют большое количество ядер (окраска Гематоксилином по Джилс (Gill's Hematoxylin)), форма клеток неправильная овальная или полигональная, иногда имеет отростки, которые постепенно сливаются с общим фоном. В силу функциональных особенностей остеокластов (деградация костной ткани) клетки могут содержать лизосомальные пузырьки.

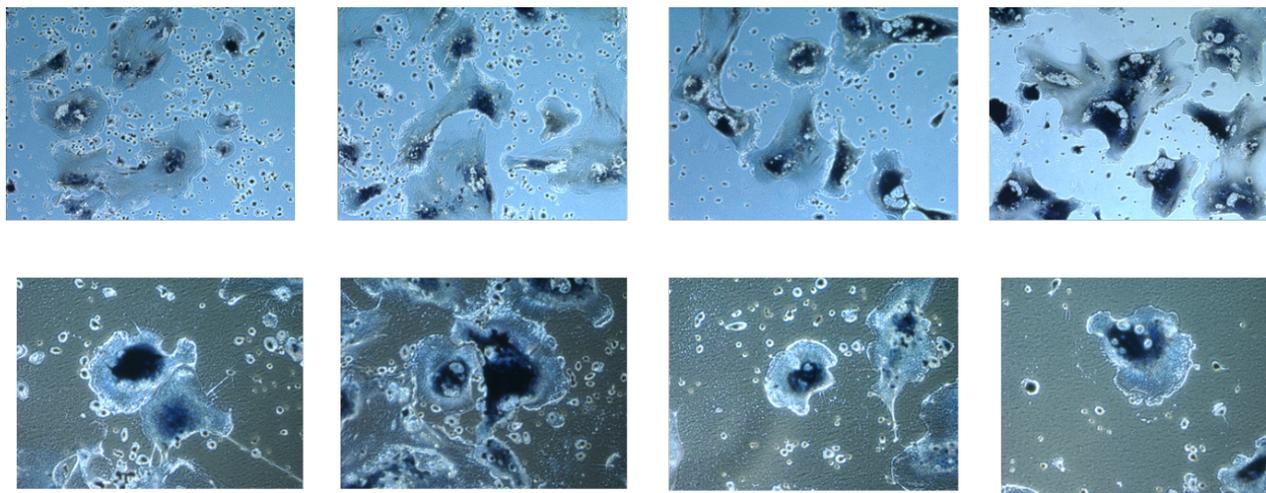


Рисунок 8 – Фазово-контрастные снимки остеокластов, окрашенных по методу TRAP. Верхний ряд – Об. x10; нижний ряд – Об. x20

Для оценки влияния полимера на активность остеокластов проводили оценку Pit Assay. На рисунке 9 показаны микрофотографии, на которых более светлые участки (указаны стрелками) являются участками резорбированного макрофагами вещества, имитирующего костную ткань (OsteoPlates, Corning). Поверхность светлых участков измеряли с помощью программного обеспечения Fiji и рассчитывали процент от общей площади микрофотографии.

На Рисунке 10 показаны данные количественного анализа площади резорбции. В качестве референтного вещества брали коммерческий препарат, содержащий алендронат. Из представленных данных видно, что в контрольной группе процент площади резорбции составил 26%. Полимер в концентрации 0,5 мг/мл уменьшает фагоцитарную активность макрофагов на 50%, а в концентрации 2мг/мл почти на 85% и имеет схожий эффект с алендронатом в концентрации 4мг/мл. Таким образом, результаты проведенного количественного анализа соот-

ветствуют ожидаемым и показывают, что концентрация полимера обратно пропорциональна площади резорбированной поверхности. Чем выше концентрация остеофильного полимера, тем активнее ингибируется фермент фарнезил пирофосфатаза, который имеет ключевое значение в метаболизме остеокластов.

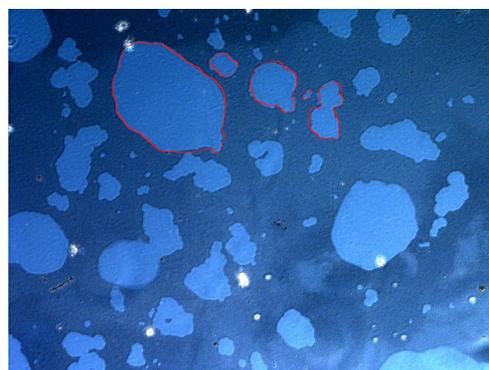


Рисунок 9 – Окрашивание Pit Assay по методу Ван Косса. Об. x10. Красными стрелками указаны места резорбции коллагенового покрытия, имитирующего костную ткань

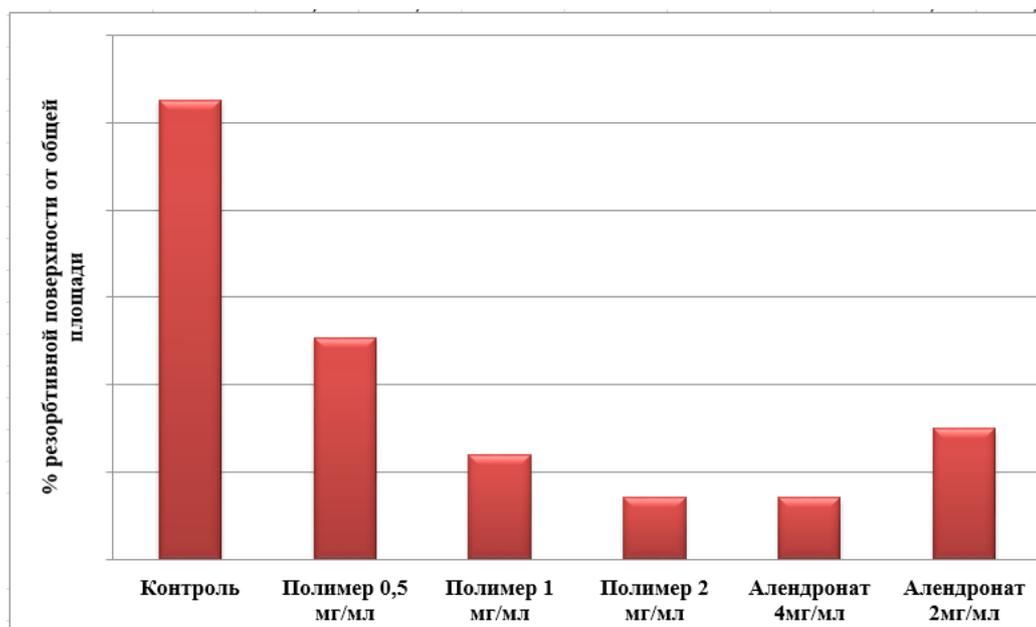


Рисунок 10 – Количественный анализ резорбтивной поверхности от общей площади ($p \leq 0.001$, one-way ANOVA)

Заключение

В результате проведенных исследований были выделены адипозные мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани крыс и проведена оценка чистоты полученной популяции AT-MSCs. Было показано, что свежеизолированная стромальная фракция жировой ткани крыс представлена гетерогенной клеточной популяцией, содержащей гемапоэтические клетки, клетки – предшественники эндотелиоцитов и мезенхимальные стволовые клетки. В результате сортировки CD105 – положительных клеток из гетерогенной популяции для дальнейших исследований была получена гомогенная клеточная культура AT-MSCs.

Было изучено влияние остеофильного бисфосфонатного полимера на пролиферацию AT-MSCs, выделенных из жировой ткани крыс. Согласно полученным данным полимер не является цитотоксичным и не оказывает

влияния на скорость пролиферации AT-MSCs *in vitro*.

Было изучено влияние полимера на остеогенную дифференцировку AT-MSCs *in vitro*. Результаты проведенного исследования показали, что поверхностная модификация AT-MSCs полимером не влияет на процессы их остеогенной дифференцировки.

Была изучена способность полимера ингибировать активность остеокластов *in vitro*. Было показано, что остеофильный полимер ингибирует фагоцитарную активность остеокластов прямо пропорционально своей концентрации и на уровне, превосходящем активность референтного вещества алендроната.

По результатам исследований, AT-MSCs, функционализированные остеофильным полимером, могут быть использованы для дальнейших экспериментов на лабораторных животных с целью оценки эффективности стимуляции репаративного остеогенеза при остеопорозе *in vivo*.

Литература

- 1 Hernlund E., Svedbom A., Ivergård M., Compston J., Cooper C., Stenmark J., McCloskey E.V., Jönsson B., Kanis J.A. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA) // Archives of Osteoporosis. – 2013. – Vol. 8, № 1-2. – P. 136.
- 2 JA K. WHO Technical Report. – University of Sheffield, UK, 2007. – 66.
- 3 Gullberg B., Johnell O., Kanis J.A. World-wide projections for hip fracture // Osteoporos Int. – 1997. – Vol. 7, № 5. – P. 407-413.

- 4 Johnell O., Kanis J.A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures // *Osteoporos Int.* -2006. -Vol. 17, № 12. – P. 1726-1733.
- 5 Giannoudis P., Tzioupis C., Almkalki T., Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective // *Injury.* -2007. -Vol. 38 Suppl 1. – P. S90-99.
- 6 Bone H.G., Hosking D., Devogelaer J.P., Tucci J.R., Emkey R.D., Tonino R.P., Rodriguez-Portales J.A., Downs R.W., Gupta J., Santora A.C., Liberman U.A. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women // *N Engl J Med.* – 2004. – Vol. 350, № 12. – P. 1189-1199.
- 7 Cranney A., Wells G., Willan A., Griffith L., Zytaruk N., Robinson V., Black D., Adachi J., Shea B., Tugwell P., Guyatt G. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women // *Endocr Rev.* -2002. -Vol. 23, № 4. – P. 508-516.
- 8 Wells G., Cranney A., Peterson J., Boucher M., Shea B., Robinson V., Coyle D., Tugwell P. Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women // *Cochrane Database Syst Rev.* -2008. № 1. – P. Cd004523.
- 9 Drake M.T., Clarke B.L., Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice // *Mayo Clinic proceedings.* -2008. -Vol. 83, № 9. – P. 1032-1045.
- 10 Teitelbaum S.L. Stem cells and osteoporosis therapy // *Cell stem cell.* -2010. -Vol. 7, № 5. – P. 553-554.
- 11 Cho S.W., Sun H.J., Yang J.Y., Jung J.Y., An J.H., Cho H.Y., Choi H.J., Kim S.W., Kim S.Y., Kim D., Shin C.S. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK-Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice // *Mol Ther.* -2009. – Vol. 17, № 11. – P. 1979-1987.
- 12 Agacayak S., Gulsun B., Ucan M.C., Karaoz E., Nergiz Y. Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2012. – Vol. 16.
- 13 Breitbart E.A., Meade S., Azad V., Yeh S., Al-Zube L., Lee Y.S. Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus // *J Orthop Res.* – 2010. – Vol. 28.
- 14 Chen K.Y., Dong G.C., Hsu C.Y., Chen Y.S., Yao C.H. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous gelatin scaffolds containing *Drynaria fortunei* extract for bone repair // *J Biomed Mater Res A.* – 2013. – Vol. 101.
- 15 Granero-Molto F., Weis J.A., Miga M.I., Landis B., Myers T.J., O'Rear L. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27.
- 16 Ito H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources // *Mod Rheumatol.* -2011. -Vol. 21.
- 17 Pak J., Lee J.H., Park K.S., Jeon J.H., Lee S.H. Potential use of mesenchymal stem cells in human meniscal repair: current insights // *Open Access J Sports Med.* – 2017. – Vol. 8. – P. 33-38.
- 18 Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutepov S.M., Mukhachev V., Lavroukov A. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells // *N Engl J Med.* – 2001. – Vol. 344.
- 19 Shao J., Zhang W., Yang T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing // *Biological Research.* – 2015. – Vol. 48, № 1. – P. 1-7.
- 20 Singh J., Onimowo J.O., Khan W.S. Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: a review of the current trend // *Curr Stem Cell Res Ther.* – 2014. – Vol. 10.
- 21 Tasso R., Ulivi V., Reverberi D., Lo S.C., Descalzi F., Cancedda R. In vivo implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells trigger a cascade of cellular events leading to the formation of an ectopic bone regenerative niche // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22.
- 22 Voss P.J., Matsumoto A., Alvarado E., Schmelzeisen R., Duttchenhofer F., Poxleitner P. Treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells // *Odontology.* -2017.
- 23 Huang S., Xu L., Zhang Y., Sun Y., Li G. Systemic and Local Administration of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promotes Fracture Healing in Rats // *Cell Transplant.* – 2015. – Vol. 24, № 12. – P. 2643-2655.
- 24 Horwitz E.M., Prockop D.J., Fitzpatrick L.A., Koo W.W., Gordon P.L., Neel M., Sussman M., Orchard P., Marx J.C., Pyeritz R.E., Brenner M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta // *Nature medicine.* – 1999. – Vol. 5, № 3. – P. 309-313.
- 25 Cancedda R., Bianchi G., Derubeis A., Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status // *Stem cells.* – 2003. – Vol. 21, № 5. – P. 610-619.
- 26 Horwitz E.M., Prockop D.J., Gordon P.L., Koo W.W., Fitzpatrick L.A., Neel M.D., McCarville M.E., Orchard P.J., Pyeritz R.E., Brenner M.K. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta // *Blood.* – 2001. – Vol. 97, № 5. – P. 1227-1231.
- 27 Gangji V., Hauzeur J.P. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique // *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* – 2005. – Vol. 87 Suppl 1, № Pt 1. – P. 106-112.
- 28 Onishi K., Jones D.L., Riester S.M., Lewallen E.A., Lewallen D.G., Sellon J.L., Dietz A.B., Qu W., van Wijnen A.J., Smith J. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Remain Viable and Metabolically Active Following Needle Passage // *Pm r.* – 2016. – Vol. 8, № 9. – P. 844-854.
- 29 De Becker A., Riet I.V. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? // *World journal of stem cells.* – 2016. – Vol. 8, № 3. – P. 73-87.
- 30 Schrepfer S., Deuse T., Reichenspurner H., Fischbein M.P., Robbins R.C., Pelletier M.P. Stem cell transplantation: the lung barrier // *Transplantation proceedings.* – 2007. – Vol. 39, № 2. – P. 573-576.

- 31 Fischer U.M., Harting M.T., Jimenez F., Monzon-Posadas W.O., Xue H., Savitz S.I., Laine G.A., Cox C.S., Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect // *Stem cells and development*. – 2009. – Vol. 18, № 5. – P. 683-692.
- 32 Eggenhofer E., Benseler V., Kroemer A., Popp F.C., Geissler E.K., Schlitt H.J., Baan C.C., Dahlke M.H., Hoogduijn M.J. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion // *Frontiers in immunology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 297.
- 33 Kurtz A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate // *International journal of stem cells*. – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 1-7.
- 34 Kidd S., Spaeth E., Dembinski J.L., Dietrich M., Watson K., Klopp A., Battula V.L., Weil M., Andreeff M., Marini F.C. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging // *Stem cells*. – 2009. – Vol. 27, № 10. – P. 2614-2623.
- 35 Sarkar D., Spencer J.A., Phillips J.A., Zhao W., Schafer S., Spelke D.P., Mortensen L.J., Ruiz J.P., Vemula P.K., Sridharan R., Kumar S., Karnik R., Lin C.P., Karp J.M. Engineered cell homing // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 25. – P. e184-191.
- 36 Guan M., Yao W., Liu R., Lam K.S., Nolte J., Jia J., Panganiban B., Meng L., Zhou P., Shahnazari M., Ritchie R.O., Lane N.E. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass // *Nature medicine*. – 2012. – Vol. 18, № 3. – P. 456-462.
- 37 Yao W., Lane N.E. Targeted delivery of mesenchymal stem cells to the bone // *Bone*. – 2015. – Vol. 70. – P. 62-65.
- 38 D'Souza S., Murata H., Jose M.V., Askarova S., Yantsen Y., Andersen J.D., Edington C.D., Clafshenkel W.P., Koepsel R.R., Russell A.J. Engineering of cell membranes with a bisphosphonate-containing polymer using ATRP synthesis for bone targeting // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, № 35. – P. 9447-9458.
- 39 Arana M., Mazo M., Aranda P., Pelacho B., Prosper F. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, and characterization // *Methods in molecular biology*. – 2013. – Vol. 1036. – P. 47-61.
- 40 Tevlin R., McArdle A., Chan C.K.F., Pluvinaige J., Walmsley G.G., Wearda T., Marecic O., Hu M.S., Paik K.J., Senarath-Yapa K., Atashroo D.A., Zielins E.R., Wan D.C., Weissman I.L., Longaker M.T. Osteoclast Derivation from Mouse Bone Marrow // *Jove-Journal of Visualized Experiments*. – 2014. № 93.
- 41 Martins C.A., Leyhausen G., Volk J., Geurtsen W. Effects of Alendronate on Osteoclast Formation and Activity In Vitro // *Journal of Endodontics*. – 2015. – Vol. 41, № 1. – P. 45-49.

References

- 1 Agacayak S, B Gulsun, MC Ucan, E Karaoz, Y Nergiz (2012) Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* vol. 16.
- 2 Arana M, M Mazo, P Aranda, B Pelacho, F Prosper (2013) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Isolation, expansion, and characterization. *Methods Mol Biol* vol. 1036, pp. 47-61.
- 3 Bone HG, D Hosking, JP Devogelaer, JR Tucci, RD Emkey, RP Tonino, JA Rodriguez-Portales, RW Downs, J Gupta, AC Santora, UA Liberman (2004) Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *The New England journal of medicine* vol. 350, pp. 1189-1199.
- 4 Breitbart EA, S Meade, V Azad, S Yeh, L Al-Zube, YS Lee (2010) Mesenchymal stem cells accelerate bone allograft incorporation in the presence of diabetes mellitus. *J Orthop Res* vol. 28.
- 5 Cancedda R, G Bianchi, A Derubeis, R Quarto (2003) Cell therapy for bone disease: A review of current status. *Stem Cells* vol. 21, pp. 610-619.
- 6 Chen KY, GC Dong, CY Hsu, YS Chen, CH Yao (2013) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous gelatin scaffolds containing *drynaria fortunei* extract for bone repair. *J Biomed Mater Res A* vol. 101.
- 7 Cho SW, HJ Sun, JY Yang, JY Jung, JH An, HY Cho, HJ Choi, SW Kim, SY Kim, D Kim, CS Shin (2009) Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing rank-fc or cxcr4 prevents bone loss in ovariectomized mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 17, pp. 1979-1987.
- 8 Cranney A, G Wells, A Willan, L Griffith, N Zytaruk, V Robinson, D Black, J Adachi, B Shea, P Tugwell, G Guyatt (2002) Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women. *Endocrine reviews* vol. 23, pp. 508-516.
- 9 D'Souza S, H Murata, MV Jose, S Askarova, Y Yantsen, JD Andersen, CD Edington, WP Clafshenkel, RR Koepsel, AJ Russell (2014) Engineering of cell membranes with a bisphosphonate-containing polymer using atrp synthesis for bone targeting. *Biomaterials* vol. 35, pp. 9447-9458.
- 10 De Becker A, IV Riet (2016) Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* vol. 8, pp. 73-87.
- 11 Drake MT, BL Clarke, S Khosla (2008) Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* vol. 83, pp. 1032-1045.
- 12 Eggenhofer E, V Benseler, A Kroemer, FC Popp, EK Geissler, HJ Schlitt, CC Baan, MH Dahlke, MJ Hoogduijn (2012) Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol* vol. 3, pp. 297.
- 13 Fischer UM, MT Harting, F Jimenez, WO Monzon-Posadas, H Xue, SI Savitz, GA Laine, CS Cox, Jr. (2009) Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* vol. 18, pp. 683-692.
- 14 Gangji V, JP Hauzeur (2005) Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. *Surgical technique. J Bone Joint Surg Am* vol. 87 Suppl 1, pp. 106-112.

- 15 Giannoudis P, C Tzioupis, T Almalki, R Buckley (2007) Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different? A basic science perspective. *Injury* vol. 38 Suppl 1, pp. S90-99.
- 16 Granero-Molto F, JA Weis, MI Miga, B Landis, TJ Myers, L O'Rear (2009) Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* vol. 27.
- 17 Guan M, W Yao, R Liu, KS Lam, J Nolta, J Jia, B Panganiban, L Meng, P Zhou, M Shahnazari, RO Ritchie, NE Lane (2012) Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass. *Nat Med* vol. 18, pp. 456-462.
- 18 Gullberg B, O Johnell, JA Kanis (1997) World-wide projections for hip fracture. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* vol. 7, pp. 407-413.
- 19 Hernlund E, A Svedbom, M Ivergård, J Compston, C Cooper, J Stenmark, EV McCloskey, B Jönsson, JA Kanis (2013) Osteoporosis in the european union: Medical management, epidemiology and economic burden: A report prepared in collaboration with the international osteoporosis foundation (iof) and the european federation of pharmaceutical industry associations (efpia). *Archives of Osteoporosis* vol. 8, pp. 136.
- 20 Horwitz EM, DJ Prockop, LA Fitzpatrick, WW Koo, PL Gordon, M Neel, M Sussman, P Orchard, JC Marx, RE Pyeritz, MK Brenner (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* vol. 5, pp. 309-313.
- 21 Horwitz EM, DJ Prockop, PL Gordon, WW Koo, LA Fitzpatrick, MD Neel, ME McCarville, PJ Orchard, RE Pyeritz, MK Brenner (2001) Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* vol. 97, pp. 1227-1231.
- 22 Huang S, L Xu, Y Zhang, Y Sun, G Li (2015) Systemic and local administration of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats. *Cell Transplant* vol. 24, pp. 2643-2655.
- 23 Ito H (2011) Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: A novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and the possible cell sources. *Mod Rheumatol* vol. 21.
- 24 JA K. 2007. Who technical report. University of Sheffield, UK.
- 25 Johnell O, JA Kanis (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* vol. 17, pp. 1726-1733.
- 26 Kidd S, E Spaeth, JL Dembinski, M Dietrich, K Watson, A Klopp, VL Battula, M Weil, M Andreeff, FC Marini (2009) Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* vol. 27, pp. 2614-2623.
- 27 Kurtz A (2008) Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int J Stem Cells* vol. 1, pp. 1-7.
- 28 Martins CA, G Leyhausen, J Volk, W Geurtsen (2015) Effects of alendronate on osteoclast formation and activity in vitro. *J Endodont* vol. 41, pp. 45-49.
- 29 Onishi K, DL Jones, SM Riestler, EA Lewallen, DG Lewallen, JL Sellon, AB Dietz, W Qu, AJ van Wijnen, J Smith (2016) Human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells remain viable and metabolically active following needle passage. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* vol. 8, pp. 844-854.
- 30 Pak J, JH Lee, KS Park, JH Jeon, SH Lee (2017) Potential use of mesenchymal stem cells in human meniscal repair: Current insights. *Open access journal of sports medicine* vol. 8, pp. 33-38.
- 31 Quarto R, M Mastrogiacomo, R Cancedda, SM Kutevov, V Mukhachev, A Lavroukov (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* vol. 344.
- 32 Sarkar D, JA Spencer, JA Phillips, W Zhao, S Schafer, DP Spelke, LJ Mortensen, JP Ruiz, PK Vemula, R Sridharan, S Kumar, R Karnik, CP Lin, JM Karp (2011) Engineered cell homing. *Blood* vol. 118, pp. e184-191.
- 33 Schrepfer S, T Deuse, H Reichenspurner, MP Fischbein, RC Robbins, MP Pelletier (2007) Stem cell transplantation: The lung barrier. *Transplant Proc* vol. 39, pp. 573-576.
- 34 Shao J, W Zhang, T Yang (2015) Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biological Research* vol. 48, pp. 1-7.
- 35 Singh J, JO Onimowo, WS Khan (2014) Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: A review of the current trend. *Curr Stem Cell Res Ther* vol. 10.
- 36 Tasso R, V Ulivi, D Reverberi, SC Lo, F Descalzi, R Cancedda (2013) In vivo implanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells trigger a cascade of cellular events leading to the formation of an ectopic bone regenerative niche. *Stem Cells Dev* vol. 22.
- 37 Teitelbaum SL (2010) Stem cells and osteoporosis therapy. *Cell Stem Cell* vol. 7, pp. 553-554.
- 38 Tevlin R, A McArdle, CKF Chan, J Pluvinae, GG Walmsley, T Wearda, O Marecic, MS Hu, KJ Paik, K Senarath-Yapa, DA Atashroo, ER Zielins, DC Wan, IL Weissman, MT Longaker (2014) Osteoclast derivation from mouse bone marrow. *Jove-J Vis Exp* vol.
- 39 Voss PJ, A Matsumoto, E Alvarado, R Schmelzeisen, F Duttonhofer, P Poxleitner (2017) Treatment of stage ii medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells. *Odontology* vol.
- 40 Wells G, A Cranney, J Peterson, M Boucher, B Shea, V Robinson, D Coyle, P Tugwell (2008) Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *The Cochrane database of systematic reviews* vol., pp. Cd004523.
- 41 Yao W, NE Lane (2015) Targeted delivery of mesenchymal stem cells to the bone. *Bone* vol. 70, pp. 62-65.

4-бөлім
МИКРОБИОЛОГИЯ

Section 4
MICROBIOLOGY

Раздел 4
МИКРОБИОЛОГИЯ

**Аскарова Ш.Н.¹, Кушугулова А.Р.², Кайырлыкызы А.³,
Цой А.К.⁴, Масуд А.⁵, Олжаев Ф.С.⁶**

¹e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

²e-mail: akushugulova@nu.edu.kz

³e-mail: aiym.kaiyrlykyzy@nu.edu.kz

⁴e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

⁵e-mail: abdulrazak.masoud@nu.edu.kz

⁶e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, Назарбаев Университет,
Казахстан, г. Астана

КИШЕЧНЫЙ МИКРОБИОМ И БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Болезнь Альцгеймера является хроническим неизлечимым нейродегенеративным заболеванием и наиболее распространенной формой возрастной деменции. На развитие этой патологии у пожилых людей влияют различные факторы, такие как образ жизни, уровень стресса, генетическая предрасположенность, хронические заболевания, а также факторы окружающей среды. Одним из факторов, влияющим на состояние здоровья человека и привлекающим все большее внимание ученых за последние 15 лет, является кишечный микробиом. Микробиом кишечника – это сообщество микроорганизмов, колонизирующих желудочно-кишечный тракт и оказывающих огромное влияние на физиологию человека в норме и патологии. В последние годы накоплена значительная информация о том, что состав кишечной микрофлоры изменяется при различных патологических состояниях организма человека, включая нейродегенеративные заболевания. В связи с вышесказанным, в настоящей обзорной статье обсуждается связь кишечного микробиома и головного мозга и роль микроорганизмов, населяющих гастроэнтеральный тракт в развитии болезни Альцгеймера.

Ключевые слова: головной мозг, нейродегенерация, болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, кишечник, кишечный микробиом.

**Askarova Sh.N.¹, Kushugulova A.R.², Kaiyrlykyzy A.³,
Tsoy A.K.⁴, Masoud A.⁵, Olzhayev F.S.⁶**

¹e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

²e-mail: akushugulova@nu.edu.kz

³e-mail: aiym.kaiyrlykyzy@nu.edu.kz

⁴e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

⁵e-mail: abdulrazak.masoud@nu.edu.kz

⁶e-mail: folzhayev@nu.edu.kz

National Laboratory Astana, JSC "Nazarbayev University,
Kazakhstan, Astana

Intestinal Microbiome and Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease is a chronic, incurable neurodegenerative disease and the most common form of age-related dementia. The on-set of this disease among the elderly population is influenced by various factors such as lifestyle, stress levels, genetic predisposition, chronic diseases, and environmental factors. Intestinal microbiome is one of the factors affecting human health and is increasingly attracting the attention of scientists over the past 15 years. Intestinal microbiomes are a community of microorganisms that colonize the gastrointestinal tract and have a huge impact on human physiology both in health and during diseases. In recent years, considerable amount of information has accumulated regarding the notion that the composition of the intestinal microflora changes with respect to various pathological conditions

of the human body, including neurodegenerative diseases. This review article, therefore discusses the relationship between intestinal microbiome and the brain and the role microorganisms inhabiting the gastro-enteric tract play in the development of Alzheimer's disease.

Key words: brain, neurodegeneration, Alzheimer's disease, amyloid- β , gut, gut microbiom.

Асқарова Ш.Н.¹, Қушугулова А.Р.², Қайырлыққызы А.³,

Цой А.К.⁴, Масуд А.⁵, Олжаев Ф.С.⁶

¹e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

²e-mail: akushugulova@nu.edu.kz

³e-mail: aiym.kaiyrlykyzy@nu.edu.kz

⁴e-mail: andrey.tsoy@nu.edu.kz

⁵e-mail: abdulrazak.masoud@nu.edu.kz

⁶e-mail: folzhayev@nu.edu.kz N

National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті,
Қазақстан, Астана қ.

Ішек микробиомы және Альцгеймер ауруы

Альцгеймер ауруы – бұл созылмалы нейродегенеративті ауру және жасқа байланысты деменцияның ең таралған түрі болып табылады. Бұл патологияның егде жастағы адамдарда дамуына өмір салты, стресс деңгейі, генетикалық бейімділік, созылмалы аурулар және қоршаған орта факторлары сияқты түрлі факторлар ықпал етеді. Соңғы он бес жылда ғалымдардың назарын аударған адам денсаулығына әсер ететін факторлардың бірі – ішек микробиомы. Ішек микробиомы – асқазан-ішек жолын колониялайтын және адам денсаулығы мен ауруларында адам физиологиясына үлкен әсер ететін микроорганизмдердің қауымдастығы болып табылады. Соңғы жылдары ішек микрофлорасының құрамы адам ағзасының әртүрлі патологиялық жағдайларында, оның ішінде нейродегенеративті аурулардың өзгеруіне байланысты айтарлықтай ақпарат жинақталған. Жоғарыда айтылғандарға байланысты, осы мақалада ішек микробиомы мен мидың өзара байланысы және Альцгеймер ауруы дамуында асқазан-ішек микроорганизмдердің рөлі талқыланады.

Түйін сөздер: бас миы, нейродегенерация, Альцгеймер ауруы, бета-амилоид, ішек, ішек микробиомы.

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является хроническим быстро прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся потерей памяти, драматическими изменениями характера и поведения, а на поздних стадиях невозможностью осуществлять нормальную ежедневную жизнедеятельность. В настоящее время БА является наиболее распространенной формой возрастной деменции [1, 2]. Уровень заболеваемости БА увеличивается с возрастом и поражает примерно 10% людей в возрасте 65-75 лет и 32% пожилых людей в возрасте 80 лет и старше [1, 2]. Согласно прогнозам Всемирной Организации Здравоохранения, ситуация с ростом заболеваемости возрастной деменции ухудшается с каждым годом, и к 2050 году количество больных увеличится в три раза. К сожалению, в настоящий момент нет точных данных по количеству пожилых людей, страдающих деменцией в Казахстане. Однако, основываясь на данных мировой статистики и учитывая тот факт, что всего Казахстан населяет 18 034 млн граждан, можно предположить, что в нашей стране не менее 200

000 человек преклонного возраста могут страдать возрастной деменцией.

Лишь небольшую долю случаев возрастной деменции можно объяснить аутосомно-доминантным наследованием; их относят к так называемой ранней семейной форме болезни Альцгеймера (БА), связанной с мутациями APP (Amyloid Precursor Protein) или ферментов, ответственных за протеолиз APP [3, 4]. Тем не менее, большинство случаев БА являются мультифакториальными с невыясненной этиологией [3, 4]. Данный вид заболевания называют «поздней» болезнью Альцгеймера спорадического типа. На развитие этой патологии у пожилых людей влияют различные факторы, такие как образ жизни, уровень стресса, наследственная предрасположенность, хронические заболевания (заболевания сердечно-сосудистой системы, сахарный диабет), физиологическое состояние организма, а также факторы, связанные с окружающей средой [5].

Одним из факторов, влияющих на состояние здоровья человека, и привлекающим все большее внимание ученых, является кишечный микробиом. Кишечник человека населяет

1000 видов и 7000 штаммов бактерий, в сумме составляющих 10^{13} - 10^{14} микроорганизмов, среди которых самыми распространенными являются бактерии, принадлежащие к отделам *Firmicutes* (51%) и *Bacteroidetes* (48%) [6]. К отделу *Firmicutes*, включающего в себя как грамположительные, так и грамотрицательные виды, принадлежат рода *Lactobacillus* (грамположительные), *Eubacterium* (грамположительные), *Clostridium* (грамположительные). К отделу *Bacteroidetes* принадлежат грамотрицательные бактерии рода *Bacteroides* and *Prevotella* [7]. **Оставшийся 1% бактерий принадлежит к другим отделам, таким как *Proteobacteria*** (грамотрицательные, в частности род *Escherichia*), *Actinobacteria* (грамположительные, в частности род *Bifidobacterium*), *Fusobacteria* (грамотрицательные), *Spirochaetes* (грамотрицательные), *Verrucomicrobia* (грамотрицательные) и *Lentisphaerae* (грамотрицательные) [8].

До недавнего времени было принято считать, что кишечный микробиом вовлечен в процессы, протекающие исключительно в кишечнике, такие как ферментация углеводов, синтез витаминов (в частности витамина В и К) и метаболизм ксенобиотиков, а также выступает барьером для патологических бактерий. Однако за последние 15 лет функции кишечного микробиома были пересмотрены, так как была показана прямая взаимосвязь между плотностью и видовым составом кишечного микробиома и развитием ряда патологических состояний, таких как диабет и ожирение [9], которые, в свою очередь, являются известными факторами риска развития спорадической формы БА. Более того, появляется все больше данных о том, что кишечный микробиом способен оказывать влияние на функции мозга [8, 10], и изменения микробиома кишечника были зарегистрированы у пациентов с БА [11]. Так как БА является возраст-ассоциированным заболеванием, особый интерес в этой связи представляют возрастные изменения состава кишечного микробиома, и возникает закономерный вопрос о том, каким образом микроорганизмы, населяющие гастроэнтеральный тракт, могут быть вовлечены в патогенез данного вида деменции.

Патогенез болезни Альцгеймера

С гистопатологической точки зрения, БА характеризуется двумя отличительными чертами – формированием в головном мозге амилоидных бляшек, состоящих из нерастворимой формы

белка бета-амилоида (A β) и образованием нейрофибриллярных клубков, состоящих из тау-белка (*p-tau*). A β образуется в нейронах путем последовательного протеолиза белка APP (*amyloid precursor protein*) с помощью ферментов β - и γ -секретазы [12]. APP – это трансмембранный белок, который экспрессируется во многих тканях; в нейронах он сосредоточен в синапсах [13, 14]. Посттрансляционный процессинг APP, осуществляемый специфическими протеазами семейства секретаз (α , β и γ), может протекать двумя путями: так называемыми «амилоидогенным» и «неамилоидогенным» [15]. Неамилоидогенный путь протеолиза APP осуществляется α -секретазой; в результате амилоидогенного процессинга β - и γ -секретазой образуются 3 молекулы – собственно A β , sAPP β и внутриклеточный домен APP (AICD – APP intracellular domain). Однажды сформировавшись, A β активирует специфические киназы, такие как гликоген синтаза (GSK-3 β) и DYRK1A, которые, в свою очередь, запускают каскад реакций, приводящих к гиперфосфорилированию и агрегации *p-tau*. Дальнейшая аккумуляция A β и *p-tau* в тканях головного мозга приводит к нейровоспалению, окислительному стрессу, митохондриальной дисфункции, нарушениям липидного обмена и кальциевого гомеостаза, дисрегуляции ферментных систем (фосфатаз, киназ, протеаз), эпигенетическим изменениям и нарушениям нейротрансмиттерных путей. В пораженных участках нервной ткани наблюдается ряд патологических нарушений структуры и функции нейронов с последующей гибелью клеток. Как следствие нейродегенеративных процессов, на поздних стадиях развития болезни происходит значительное уменьшение объема головного мозга, приводящее к прогрессирующей потере памяти и речевых навыков, утрате способностей к самообслуживанию и управлению физиологическими процессами.

Влияние кишечного микробиома на функции головного мозга

Центральная нервная система (ЦНС) регулирует проницаемость, секрецию, перистальтику и иммунитет пищеварительного тракта путем воздействия на энтеральную нервную систему, мышечные ткани и мукозный слой кишечника через эфферентные автономные нервные пути [16]. Так же есть данные о том, что высокий уровень стресса в ЦНС влияет на физиологию кишечника и может вызывать изменения состава

кишечной флоры [17]. В свою очередь, кишечный микробиом способен оказывать влияние на функции головного мозга через афферентные сигнальные пути, а также посредством секреции биологически активных веществ [18, 19]. Опубликован ряд работ о том, что дисбактериоз кишечника, вызванный изменениями диеты и патогенными микроорганизмами, а также использованием антибиотиков, пробиотиков, нестероидных противовоспалительных препаратов влияет на когнитивные функции мозга [20, 21].

Так, было показано, что острый стресс и инфицирование условно-патогенными микроорганизмами (*Citrobacter rodentium*) приводит к расстройствам памяти у мышей линии C57BL/6 [22]. Более того, у стерильных мышей линии Swiss-Webster, содержащихся в условиях, исключающих постнатальную колонизацию кишечника бактериями, дефицит пространственной и рабочей памяти наблюдался вне зависимости от инфекции и стресса и сопровождался сниженной экспрессией нейротрофического фактора головного мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) [22]. BDNF является одним из ключевых нейротрофинов, играющих важную функцию в синаптической пластичности, и существуют данные о сниженном уровне BDNF в головном мозге и сыворотке пациентов, страдающих БА [23]. Напротив, исследования, проведенные Neufeld и др. выявили повышенное содержание BDNF в миндалевидном теле стерильных мышей, пониженную экспрессию мРНК, кодирующих рецептор серотонина (5HT_{1A}) и NR2B субъединицу рецептора NMDA (ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат) в зубчатой фасции гиппокампа [24].

Wang и др. продемонстрировали, что применение антибиотика ампициллина на протяжении 1 месяца у крыс, вызывает дисбактериоз кишечника, понижает содержание NMDA рецептора и минералокортикоидов в миндалевидном теле, повышает агрессивность животных и вызывает нарушения пространственной памяти, в то время как присутствие в составе микробиома кишечника штамма *Lactobacillus fermentum* NS9 нормализует эти показатели [25]. Другое исследование проведенное Liang и соавторами, показало, что пробиотик *Lactobacillus helveticus* NS8 значительно улучшает вызванные хроническим стрессом когнитивные расстройства у крыс породы Sprague-Dawley, выращенных в стерильных условиях [26]. *L. helveticus* NS8 также снижал содержание в плазме крови кортикостерона

и адренокортикотропного гормона и повышал содержание противовоспалительного цитокина *IL-10*, восстанавливал уровень серотонина и нораэпинефрина, и повышал экспрессию BDNF в гиппокампе [26]. Сходные данные были получены Luo и соавторами [27] и Ohsawa и соавторами [28]. В дополнение, пробиотик *Bifidobacterium Longum* 1714 улучшал когнитивные функции у самцов мышей линии BALB/c [29].

Изменения состава кишечного микробиома при болезни Альцгеймера

Исследования образцов стула полученных от трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий ген APP и PS1 (CONVR-APPPS1, животная модель болезни Альцгеймера), показали значительные отличия состава кишечного микробиома этих животных по сравнению с мышами дикого типа [30]. Так, у восьмимесячных мышей линии CONVR-APPPS1 наблюдалось значительное снижение содержания количества бактерий отдела *Firmicutes Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, и увеличение содержания бактерий, принадлежащим к отделам *Bacteroidetes* и *Tenericutes* по сравнению с мышами сходного возраста, относящихся к дикому типу. В то же самое время, у мышей линии CONVR-APPPS1, выращенных в стерильных условиях, наблюдалось значительное уменьшение отложений A β в головном мозге по сравнению животными этого же генотипа, содержавшимися в обычных условиях. Более того, колонизация кишечника мышей линии CONVR-APPPS1, выращенных в стерильных условиях, микробиотой, полученной от этих же мышей, содержащихся в обычных условиях, приводило к усилению патологических отложений A β в центральной нервной системе, в то время как фекальная трансплантация от мышей дикого типа не приводила к значительному повышению содержания A β в головном мозге. Результаты этого исследования доказывают влияние кишечного микробиома на развитие амилоидной патологии у трансгенных животных и указывают на возможную роль кишечного микробиома, как одного из факторов патогенеза БА.

Выводы из исследований, проведенных на лабораторных животных, подтверждаются клиническими данными, полученными при изучении кишечного микробиома пожилых людей. Так, была показана ассоциация амилоидоза головного мозга с провоспалительными кишечными бактериальными таксонами и пе-

риферическими маркерами воспаления у людей преклонного возраста, страдающими когнитивными расстройствами [31]. Результаты данного исследования продемонстрировали, что у дементных пациентов с амилоидозом повышенный уровень про-воспалительных цитокинов в крови (*IL-6*, *CXCL2*, *NLRP3*, и *IL-1 β*) сопровождался уменьшенным содержанием в образцах стула противовоспалительных кишечных бактерий, принадлежащих к таксону *E. rectale*, и повышенным содержанием провоспалительных кишечных бактерий, принадлежащих к таксону *Escherichia/Shigella*.

Изучение состава микробиома кишечника у пациентов Научно-Исследовательского центра по изучению болезни Альцгеймера (Wisconsin Alzheimer's disease Research Center, США) выявило существенные таксономические различия состава кишечного микробиома у пациентов с БА и здоровых людей как на уровне отделов, так и видовом уровне [32]. Данные исследования продемонстрировали уменьшение количества бактерий отдела *Firmicutes* и *Actinobacteria* (в частности бактерий рода *Bifidobacterium*), и увеличение количества бактерий, принадлежащих к отделам *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* в составе микробиома кишечника больных БА. В целом была идентифицирована количественная разница между 13 родами бактерий у больных и здоровых участников исследования. В дополнение, была показана дифференциальная корреляция между уровнями содержания отдельных родов бактерий в кишечнике и цереброспинальными маркерами БА, такими как $A\beta_{42}$ / $A\beta_{40}$, p-tau, а также соотношение $A\beta/p\text{-tau}$ [32].

Исследования, проведенные в Медицинском университете Chongqing (Китай), также выявили достоверные различия в составе бактерий, заселяющих кишечник пациентов с БА, в таких таксономических группах как *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, and *Selenomonadales* [33]. Тем не менее, качественные изменения кишечного микробиома у китайских пациентов несколько отличались от таковых в США. Zhuang и др. показали уменьшение количества бактерий, принадлежащих к отделу *Bacteroidetes*, в то время как количество бактерий отдела *Firmicutes* не изменялось по сравнению со здоровым контролем. Эти различия могут быть связаны с рядом факторов, включая сопутствующие заболевания, этническую принадлежность, образ жизни и пищевые предпочтения [34]. Таким

образом результаты проведенных исследований доказывают взаимосвязь кишечного микробиома и амилоидной патологии и указывают на возможную роль кишечного микробиома в развитии БА.

Возможные механизмы влияния кишечного микробиома на патогенез болезни Альцгеймера

Как уже упоминалось, спорадическая форма БА является мультифакториальным заболеванием с невыясненной этиологией, на развитие которой влияют различные факторы [3-5]. Так как преклонный возраст является основным фактором риска БА, возрастные физиологические изменения, в том числе изменения микробиома могут играть определенную роль в развитии деменции.

Результаты ряда исследований показали, что с возрастом состав кишечного микробиома претерпевает существенные изменения [35, 36]. Так, было показано, что общехарактерные возрастные изменения в составе кишечной микрофлоры включают увеличение числа факультативных анаэробов, изменения в доминировании видов, в то же время сохраняется стабильность в общем числе анаэробов [37, 38]. Hopkins с соавторами заметили, что по сравнению с молодыми людьми у пожилых уровень *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* был ниже [39]. В то время как в составе микробиоты взрослого организма содержится 4-5 видов рода *Bifidobacterium*, в пожилом возрасте встречается лишь один из доминирующих видов этого рода: *Bifidobacterium adolescentis*, либо фенотипически близкие *Bifidobacterium angulatum* и *Bifidobacterium longum* [39, 40]. Одним из объяснений снижения видового и количественного состава бифидобактерий у пожилых людей является снижение их адгезии из-за изменения химического состава и структуры слизистой оболочки толстой кишки, что приводит к ограничению функциональности и иммунологической реактивности в кишечнике, и повышенной восприимчивости к желудочно-кишечным инфекциям [41]. В свою очередь, бактерии *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* активно участвуют в продукции аминокислоты (γ-Aminobutyric acid, GABA) [42, 43]. GABA является важнейшим тормозным медиатором центральной нервной системы человека и других млекопитающих, принимающим участие в нейромедиаторных и метаболических процессах в головном мозге. Доказано, что уровень аминокислоты

в кишечнике коррелирует с его уровнем в ЦНС, и снижение уровня *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* приводят к дисфункции, ассоциированной с нарушениями синаптогенеза, депрессией и когнитивными нарушениями [42].

Многие авторы сходятся во мнении, что с возрастом изменяется разнообразие видов *Bacteroides* [44, 45]. В исследованиях, проводимых группой ученых под руководством Tongeren, было обнаружено, что в микробиоте лиц в возрасте от 70 до 100 лет преобладали *Bacteroides/Prevotella*, *Eubacterium rectale/Clostridium coccooides* и *Ruminococcus* [46]. Также, для микробиоты кишечника лиц пожилого возраста характерен рост протеолитических бактерий, таких как *Fusobacteria*, *Propionibacteria* и *Clostridia*, что приводит к развитию гнилостных процессов, особенно у пациентов после антибиотикотерапии, это подтверждается данными о повышении протеолитической активности [39, 47]. Кроме того, отмечается увеличение числа провоспалительных энтеробактерий, стрептококков, стафилококков и дрожжевых клеток, что, возможно, связано с повышенным содержанием сывороточных антител к комменсальной микрофлоре кишечника, таким как *Escherichia coli* и *Enterococcus faecalis*.

Снижение количества и видового разнообразия многих полезных анаэробов таких как бактериоиды, бифидобактерии, а также сдвиг видового разнообразия кишечной микробиоты в сторону условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, приводит к изменениям локальных химических и иммунологических показателей, индуцирует транслокацию кишечной флоры в региональную лимфоидную ткань [48]. Указанные факторы способствуют повышению проницаемости кишечного и гематоэнцефалического барьеров и проникновению патологической микрофлоры и их метаболитов в головной мозг [49, 50].

С другой стороны, бактерии, входящие в состав кишечного микробиома, способны секретировать в большом количестве функциональные амилоидные пептиды и липополисахариды (ЛПС). Амилоиды бактерий, выполняющие различные функциональные задачи на поверхности бактериальных клеток, такие как формирование биопленок, адгезия, взаимодействие с другими бактериальными и эукариотическими клетками и т.д., имеют сходные с патологическим амилоидом человека структуру и биофизические свойства [51]. Например, провоспалительные условно-патогенные штаммы кишечных бактерий, таких как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*

tyrhimurium и *Salmonella enterica* способны секретировать большое количество бактериального амилоидного пептида curli [52, 53]. Пептид curli, также как и A β , способен формировать вторичную структуру в виде β -складчатых листов, окрашивается тиофлавином и конго красным (красители, используемые для окрашивания амилоидных бляшек головного мозга). Было показано, что основная структурная субъединица пептида curli – предшественник амилоида gA (gA amyloid precursor), имеет в своей структуре сходные с A β_{42} участки, способные распознаваться человеческим рецептором TLR2 (toll-like receptor 2) [54]. В свою очередь, взаимодействие TLR2 с пептидом curli или человеческим A β_{42} приводит к активации макрофагов костного мозга и выработке ими провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-1 β [54]. В сходном исследовании было показано, что микробный амилоид способен активировать Т-лимфоциты и индуцировать выработку провоспалительных интерлейкинов IL-17A и IL-22 [55]. Эти цитокины способны проникать через ГЭБ, вызывая выработку активных форм кислорода, активацию сигнальных путей TLR2/1 и NF κ B в клетках микроглии и астроцитах, что напрямую связано с нейровоспалением и нейродегенерацией [56-58]. В свою очередь, Chen и соавторы продемонстрировали, что пероральная контаминация старых крыс (предварительно подвергшихся процедуре ирадикации антибиотиками) диким штаммом *E. coli*, способным продуцировать функциональный пептид curli, приводила к усилению в тканях головного мозга микроглиоза и астроглиоза и повышенной экспрессии TLR2, IL-6 и TNF по сравнению с животными, инфицированными мутантными штаммами бактерий, не способных производить функциональный амилоид [59].

Помимо амилоидного пептида, многие штаммы кишечных бактерий выделяют ЛПС. ЛПС являются главными компонентами наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий и, в случае проникновения из кишечной полости в кровотоки, способны вызывать воспалительные реакции в нервной системе. Опубликованы данные о том, что содержание ЛПС в плазме крови пациентов, страдающих спорадической формой латерального склероза и БА, в три раза превышает физиологическую возрастную норму [60]. Post-mortem исследования выявили, что содержание ЛПС в неокортексе и гиппокампе у пациентов, страдавших БА, было в два-три раза (а в некоторых случаях и в 26 раз) выше, чем у пожилых людей того же возраста, не страдавших

ми когнитивными расстройствами [61]. В свою очередь, исследования на лабораторных животных показали, что внутрижелудочковое введение ЛПС на протяжении 4 недель способно вызывать хроническое воспаление в головном мозге, гибель нервных клеток II и III слоев энторинальной коры и нарушение долговременной синаптической пластичности нейронов зубчатой извилины гиппокампа, что является одними из характерных признаков поражения височной доли больших полушарий при БА [62].

Также существуют данные о том, ЛПС, выделяемые штаммами бактерий *Bacteroides fragilis*, способны активировать вовлеченный в патогенез БА провоспалительный транскрипционный фактор NFκB в культуре первичных клеток микроглии человека [63]. В свою очередь, NFκB индуцирует транскрипцию семейства провоспалительных микро-РНК, таких как miRNA-9, miRNA-34a, miRNA-125b, miRNA-146a, and miRNA-155, активирующих медиаторы нейровоспаления и угнетающих фагоцитоз [63]. Например, было показано, что микро-РНК-34a ингибирует экспрессию TREM2 (triggering receptor expressed on microglia/myeloid cells-2), тем самым нарушая фагоцитарную способность микроглии и усиливая аккумуляцию Aβ₄₂ [64]. В подтверждение данного предположения, внутрибрюшинное введение ЛПС мышам линии C57BL/6J приводило к увеличению содержания Aβ₄₂ в головном мозге и вызывало когнитивный дефицит [65]. *In vitro*, эндотоксины, выделяемые штаммами кишечной палочки (*E.coli*), ускоряли агрегацию Aβ и образование фибрилл [66]. Jaeger и соавторы показали, что внутрибрюшинное введение ЛПС нарушает транспорт Aβ через гематоэнцефалический барьер, увеличивая уровень его поступления в направлении паренхимы мозга и уменьшая его обратный транспорт [67].

Также было показано, что внутрижелудочковая инфузия ЛПС в сочетании с аскорбиновой кислотой увеличивала иммунореактивность внутринейронного бета-амилоида [68].

Заключение

В процессе старения организма состав кишечного микробиома претерпевает существенные изменения, характеризующиеся уменьшением количества бактерий, считающихся полезными, такими как *Bacteroidetes*, *Lactobacillus* и *Bifidobacteria* и увеличением провоспалительных штаммов, таких как *Propionibacteria* и *Clostridia*. Исследования показали, что дисбиоз и плохо диверсифицированная микробиота влияет на синтез и секрецию нейротрофических факторов, таких как BDNF, NMDA рецептор и GABA. В свою очередь, провоспалительные условно-патогенные штаммы кишечных бактерий способны секретировать являющиеся эндотоксинами бактериальный амилоид и липополисахариды. Так как у лиц преклонного возраста происходят нарушения барьерной функции кишечной стенки и гематоэнцефалического барьера, данные эндотоксины способны проникать из полости кишечника в кровотоки, и далее, в ткани головного мозга, и оказывать прямое и/или системное негативное воздействие на структуру и функции центральной нервной системы. Таким образом, исследования последних лет свидетельствуют о том, что кишечный микробиом способен модулировать нейрохимические и нейрональные метаболические сигнальные пути головного мозга путем образования двухсторонней коммуникационной оси с вовлечением эндокринной и иммунной системы, и способствовать развитию нейровоспаления и нейродегенерации.

Литература

- 1 Prince M., Ali G.-C., Guerchet M., Prina A.M., Albanese E., Wu Y.-T. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia // *Alzheimer's Research & Therapy*. – 2016. – Vol. 8. – P. 23.
- 2 Alzheimer's disease facts and figures // *Alzheimer's Association annual report*. -2018.
- 3 Panegyres P.K., Chen H.Y. Differences between early and late onset Alzheimer's disease // *Am J Neurodegener Dis*. – 2013. – Vol. 2, № 4. – P. 300-306.
- 4 Panegyres P.K., Chen H.Y. Early-onset Alzheimer's disease: a global cross-sectional analysis // *Eur J Neurol*. -2014.
- 5 Prince M. A.E., Guerchet M., Prina M. World Alzheimer Report 2014. Dementia and Risk Reduction – London : Alzheimer's Disease International, 2014. URL: <http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2014.pdf>.
- 6 Huttenhower C. G.D., Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T., et al., and White O. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome // *Nature*. – 2012. – Vol. 486, № 7402. – P. 207-214.
- 7 Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y.,

Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Dore J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, № 7285. – P. 59-65.

8 Westfall S., Lomis N., Kahouli I., Dia S.Y., Singh S.P., Prakash S. Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis // *Cell Mol Life Sci*. -2017. -Vol. 74, № 20. – P. 3769-3787.

9 Cani P.D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises // *Gut*. -2018. -Vol. 67, № 9. – P. 1716-1725.

10 Zhu X., Han Y., Du J., Liu R., Jin K., Yi W. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 32. – P. 53829-53838.

11 Larroya-Garcia A., Navas-Carrillo D., Orenes-Pinero E. Impact of gut microbiota on neurological diseases: Diet composition and novel treatments // *Crit Rev Food Sci Nutr*. – 2018. – P. 1-15.

12 LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease // *Nat Rev Neurosci*. – 2007. – Vol. 8, № 7. – P. 499-509.

13 William C.M., Andermann M.L., Goldey G.J., Roumis D.K., Reid R.C., Shatz C.J., Albers M.W., Frosch M.P., Hyman B.T. Synaptic plasticity defect following visual deprivation in Alzheimer's disease model transgenic mice // *J Neurosci*. – 2012. – Vol. 32, № 23. – P. 8004-8011.

14 Westmark C.J. What's hAPPening at synapses? The role of amyloid beta-protein precursor and beta-amyloid in neurological disorders // *Mol Psychiatry*. – 2013. – Vol. 18, № 4. – P. 425-434.

15 Cole S.L., Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1 // *Molecular neurodegeneration*. – 2007. – Vol. 2. – P. 22.

16 Carabotti M., Scirocco A., Maselli M.A., Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems // *Ann Gastroenterol*. -2015. -Vol. 28, № 2. – P. 203-209.

17 Moloney R.D., Johnson A.C., O'Mahony S.M., Dinan T.G., Greenwood-Van Meerveld B., Cryan J.F. Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome // *CNS Neurosci Ther*. – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 102-117.

18 Petra A.I., Panagiotidou S., Hatziagelaki E., Stewart J.M., Conti P., Theoharides T.C. Gut-Microbiota-Brain Axis and Its Effect on Neuropsychiatric Disorders With Suspected Immune Dysregulation // *Clin Ther*. – 2015. – Vol. 37, № 5. – P. 984-995.

19 Burokas A., Moloney R.D., Dinan T.G., Cryan J.F. Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis // *Adv Appl Microbiol*. -2015. -Vol. 91. – P. 1-62.

20 Gareau M.G. Microbiota-gut-brain axis and cognitive function // *Adv Exp Med Biol*. – 2014. – Vol. 817. – P. 357-371.

21 Jiang C., Li G., Huang P., Liu Z., Zhao B. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis*. – 2017. – Vol. 58, № 1. – P. 1-15.

22 Gareau M.G., Wine E., Rodrigues D.M., Cho J.H., Whary M.T., Philpott D.J., Macqueen G., Sherman P.M. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice // *Gut*. – 2011. – Vol. 60, № 3. – P. 307-317.

23 Michalski B., Corrada M.M., Kawas C.H., Fahnestock M. Brain-derived neurotrophic factor and TrkB expression in the "oldest-old," the 90+ Study: correlation with cognitive status and levels of soluble amyloid-beta // *Neurobiol Aging*. – 2015. – Vol. 36, № 12. – P. 3130-3139.

24 Neufeld K.M., Kang N., Bienenstock J., Foster J.A. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice // *Neurogastroenterol Motil*. – 2011. – Vol. 23, № 3. – P. 255-264, e119.

25 Wang T., Hu X., Liang S., Li W., Wu X., Wang L., Jin F. Lactobacillus fermentum NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats // *Benef Microbes*. – 2015. – Vol. 6, № 5. – P. 707-717.

26 Liang S., Wang T., Hu X., Luo J., Li W., Wu X., Duan Y., Jin F. Administration of Lactobacillus helveticus NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress // *Neuroscience*. -2015. -Vol. 310. – P. 561-577.

27 Luo J., Wang T., Liang S., Hu X., Li W., Jin F. Ingestion of Lactobacillus strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat // *Sci China Life Sci*. -2014. -Vol. 57, № 3. – P. 327-335.

28 Ohsawa K., Uchida N., Ohki K., Nakamura Y., Yokogoshi H. Lactobacillus helveticus-fermented milk improves learning and memory in mice // *Nutr Neurosci*. – 2015. – Vol. 18, № 5. – P. 232-240.

29 Savignac H.M., Tramullas M., Kiely B., Dinan T.G., Cryan J.F. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain // *Behav Brain Res*. – 2015. – Vol. 287. – P. 59-72.

30 Harach T., Marunguang N., Duthilleul N., Cheatham V., Mc Coy K.D., Frisoni G., Neher J.J., Fak F., Jucker M., Lasser T., Bolmont T. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – P. 41802.

31 Cattaneo A., Cattane N., Galluzzi S., Provasi S., Lopizzo N., Festari C., Ferrari C., Guerra U.P., Paghera B., Muscio C., Bianchetti A., Volta G.D., Turla M., Cotelli M.S., Gennuso M., Prellè A., Zanetti O., Lussignoli G., Mirabile D., Bellandi D., Gentile S., Belotti G., Villani D., Harach T., Bolmont T., Padovani A., Boccardi M., Frisoni G.B. Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly // *Neurobiology of Aging*. – 2017. – Vol. 49. – P. 60-68.

32 Vogt N.M., Kerby R.L., Dill-McFarland K.A., Harding S.J., Merluzzi A.P., Johnson S.C., Carlsson C.M., Asthana S., Zetterberg H., Blennow K., Bendlin B.B., Rey F.E. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 13537.

33 Zhuang Z.Q., Shen L.L., Li W.W., Fu X., Zeng F., Gui L., Lu Y., Cai M., Zhu C., Tan Y.L., Zheng P., Li H.Y., Zhu J., Zhou H.D., Bu X.L., Wang Y.J. Gut Microbiota is Altered in Patients with Alzheimer's Disease // *J Alzheimers Dis*. – 2018. – Vol. 63, № 4. – P. 1337-1346.

- 34 Tasnim N., Abulizi N., Pither J., Hart M.M., Gibson D.L. Linking the Gut Microbial Ecosystem with the Environment: Does Gut Health Depend on Where We Live? // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1935.
- 35 Salazar N., Valdes-Varela L., Gonzalez S., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilan C.G. Nutrition and the gut microbiome in the elderly // *Gut Microbes*. – 2017. – Vol. 8, № 2. – P. 82-97.
- 36 Nagpal R., Mainali R., Ahmadi S., Wang S., Singh R., Kavanagh K., Kitzman D.W., Kushugulova A., Marotta F., Yadav H. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights // *Nutrition and Healthy Aging*. – 2018. – Vol. 4, № 4. – P. 267-285.
- 37 Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimaraes V., Sokol H., Dore J., Corthier G., Furet J.P. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age // *BMC Microbiol*. – 2009. – Vol. 9. – P. 123.
- 38 Satokari R., Rantanen R., Pitka I., Salminen S. Probiotics and prebiotics in the elderly individuals // *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients – Health benefits and food applications* Cho S., Finocchiaro E. – Taylor and Francis: CRC Press, Boca Raton 2010. – P. 341–353.
- 39 Hopkins M.J., Macfarlane G.T. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection // *J Med Microbiol*. – 2002. – Vol. 51, № 5. – P. 448-454.
- 40 Gavini F., Cayuela C., Antoine J.-M., Lecoq C., Lefebvre B., J-M M., Neut C. Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of three different (children, adults, elderly) age groups // *Microb Ecol Health Dis*. – 2001. – Vol. 13, № 1. – P. 40-45.
- 41 He F., Ouwehand A.C., Isolauri E., Hosoda M., Benno Y., Salminen S. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors // *Curr Microbiol*. – 2001. – Vol. 43, № 5. – P. 351-354.
- 42 Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota // *Brain Research*. – 2018. – Vol. 1693. – P. 128-133.
- 43 Junges V.M., Closs V.E., Nogueira G.M., Gottlieb M.G.V. Crosstalk Between Gut Microbiota and the Central Nervous System: A Focus for Alzheimer's Disease // *Curr Alzheimer Res*. – 2018.
- 44 Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T., McMurdo M.E.T. Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – Vol. 70, № 6. – P. 3575-3581.
- 45 Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Saylor G. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water // *Appl Environ Microbiol*. – 2006. – Vol. 72, № 6. – P. 4214-4224.
- 46 van Tongeren S.P., Slaets J.P., Harmsen H.J., Welling G.W. Fecal microbiota composition and frailty // *Appl Environ Microbiol*. – 2005. – Vol. 71, № 10. – P. 6438-6442.
- 47 Woodmansey E.J., McMurdo M.E., Macfarlane G.T., Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects // *Appl Environ Microbiol*. – 2004. – Vol. 70, № 10. – P. 6113-6122.
- 48 Nagpal R., Mainali R., Ahmadi S., Wang S., Singh R., Kavanagh K., Kitzman D.W., Kushugulova A., Marotta F., Yadav H. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights // *Nutr Healthy Aging*. – 2018. – Vol. 4, № 4. – P. 267-285.
- 49 Elahy M., Jackaman C., Mamo J.C.L., Lam V., Dhaliwal S.S., Giles C., Nelson D., Takechi R. Blood-brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment // *Immunity & Ageing*. – 2015. – Vol. 12, № 1. – P. 2.
- 50 Tran L., Greenwood-Van Meerveld B. Age-Associated Remodeling of the Intestinal Epithelial Barrier // *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2013. – Vol. 68, № 9. – P. 1045-1056.
- 51 Evans M.L., Gichana E., Zhou Y., Chapman M.R. Bacterial Amyloids // *Methods Mol Biol*. – 2018. – Vol. 1779. – P. 267-288.
- 52 Schwartz K., Boles B.R. Microbial amyloids--functions and interactions within the host // *Curr Opin Microbiol*. – 2013. – Vol. 16, № 1. – P. 93-99.
- 53 Hufnagel D.A., Tükel C., Chapman M.R. Disease to dirt: the biology of microbial amyloids // *PLoS Pathog*. – 2013. – Vol. 9, № 11. – P. e1003740.
- 54 Rapsinski G.J., Wynosky-Dolfi M.A., Oppong G.O., Tursi S.A., Wilson R.P., Brodsky I.E., Tükel C. Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli // *Infect Immun*. – 2015. – Vol. 83, № 2. – P. 693-701.
- 55 Nishimori J.H., Newman T.N., Oppong G.O., Rapsinski G.J., Yen J.-H., Biesecker S.G., Wilson R.P., Butler B.P., Winter M.G., Tsois R.M., Ganea D., Tükel Ç. Microbial Amyloids Induce Interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 Responses via Toll-Like Receptor 2 Activation in the Intestinal Mucosa // *Infection and Immunity*. – 2012. – Vol. 80, № 12. – P. 4398-4408.
- 56 Sun J., Zhang S., Zhang X., Zhang X., Dong H., Qian Y. IL-17A is implicated in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in aged rats via microglial activation // *Journal of Neuroinflammation*. – 2015. – Vol. 12. – P. 165.
- 57 Perriard G., Mathias A., Enz L., Canales M., Schlupe M., Gentner M., Schaeren-Wiemers N., Du Pasquier R.A. Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes // *Journal of Neuroinflammation*. – 2015. – Vol. 12. – P. 119.
- 58 Zhan X., Stamova B., Sharp F.R. Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: A Review // *Front Aging Neurosci*. – 2018. – Vol. 10. – P. 42.
- 59 Chen S.G., Stribinskis V., Rane M.J., Demuth D.R., Gozal E., Roberts A.M., Jagadapillai R., Liu R., Choe K., Shivakumar B., Son F., Jin S., Kerber R., Adame A., Masliah E., Friedland R.P. Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans* // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 34477.
- 60 Zhang R., Miller R.G., Gascon R., Champion S., Katz J., Lancero M., Narvaez A., Honrada R., Ruvalcaba D., McGrath M.S. Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS) // *J Neuroimmunol*. – 2009. – Vol. 206, № 1-2. – P. 121-124.
- 61 Zhao Y., Jaber V., Lukiw W.J. Secretory Products of the Human GI Tract Microbiome and Their Potential Impact on Al-

zheimer's Disease (AD): Detection of Lipopolysaccharide (LPS) in AD Hippocampus // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 318.

62 Hauss-Wegrzyniak B., Lynch M.A., Vraniak P.D., Wenk G.L. Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired LTP in perforant path-granule cell synapses // *Exp Neurol*. – 2002. – Vol. 176, № 2. – P. 336-341.

63 Zhao Y., Lukiw W.J. Bacteroidetes Neurotoxins and Inflammatory Neurodegeneration // *Mol Neurobiol*. -2018.

64 Bhattacharjee S., Zhao Y., Dua P., Rogaev E.I., Lukiw W.J. microRNA-34a-Mediated Down-Regulation of the Microglial-Enriched Triggering Receptor and Phagocytosis-Sensor TREM2 in Age-Related Macular Degeneration // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 3. – P. e0150211.

65 Kahn M.S., Kranjac D., Alonzo C.A., Haase J.H., Cedillos R.O., McLinden K.A., Boehm G.W., Chumley M.J. Prolonged elevation in hippocampal Abeta and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse // *Behav Brain Res*. – 2012. – Vol. 229, № 1. – P. 176-184.

66 Asti A., Gioglio L. Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation? // *J Alzheimers Dis*. – 2014. – Vol. 39, № 1. – P. 169-179.

67 Jaeger L.B., Dohgu S., Sultana R., Lynch J.L., Owen J.B., Erickson M.A., Shah G.N., Price T.O., Fleegal-Demotta M.A., Butterfield D.A., Banks W.A. Lipopolysaccharide Alters the Blood-brain Barrier Transport of Amyloid Beta Protein: A Mechanism for Inflammation in the Progression of Alzheimer's Disease // *Brain, behavior, and immunity*. – 2009. – Vol. 23, № 4. – P. 507-517.

68 Hauss-Wegrzyniak B., Wenk G.L. Beta-amyloid deposition in the brains of rats chronically infused with thiorphan or lipopolysaccharide: the role of ascorbic acid in the vehicle // *Neurosci Lett*. – 2002. – Vol. 322, № 2. – P. 75-78.

References

- 1 (2018) Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Association annual report vol.
- 2 Asti A, L Gioglio (2014) Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation? *Journal of Alzheimer's disease* : JAD vol. 39, pp. 169-179.
- 3 Bartosch S, A Fite, GT Macfarlane, MET McMurdo (2004) Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time pcr and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology* vol. 70, pp. 3575-3581.
- 4 Bhattacharjee S, Y Zhao, P Dua, EI Rogaev, WJ Lukiw (2016) Microrna-34a-mediated down-regulation of the microglial-enriched triggering receptor and phagocytosis-sensor trem2 in age-related macular degeneration. *PloS one* vol. 11, pp. e0150211.
- 5 Burokas A, RD Moloney, TG Dinan, JF Cryan (2015) Microbiota regulation of the mammalian gut-brain axis. *Advances in applied microbiology* vol. 91, pp. 1-62.
- 6 Cani PD (2018) Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. *Gut* vol. 67, pp. 1716-1725.
- 7 Carabotti M, A Scirocco, MA Maselli, C Severi (2015) The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of gastroenterology* vol. 28, pp. 203-209.
- 8 Cattaneo A, N Cattane, S Galluzzi, S Provasi, N Lopizzo, C Festari, C Ferrari, UP Guerra, B Paghera, C Muscio, A Bianchetti, GD Volta, M Turla, MS Cotelli, M Gennuso, A Prella, O Zanetti, G Lussignoli, D Mirabile, D Bellandi, S Gentile, G Belotti, D Villani, T Harach, T Bolmont, A Padovani, M Boccardi, GB Frisoni (2017) Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly. *Neurobiology of Aging* vol. 49, pp. 60-68.
- 9 Chen SG, V Stribinskis, MJ Rane, DR Demuth, E Gozal, AM Roberts, R Jagadapillai, R Liu, K Choe, B Shivakumar, F Son, S Jin, R Kerber, A Adame, E Maslah, RP Friedland (2016) Exposure to the functional bacterial amyloid protein curli enhances alpha-synuclein aggregation in aged fischer 344 rats and caenorhabditis elegans. *Scientific Reports* vol. 6, pp. 34477.
- 10 Cole SL, R Vassar (2007) The alzheimer's disease beta-secretase enzyme, bace1. *Molecular neurodegeneration* vol. 2, pp. 22.
- 11 Elahy M, C Jackaman, JCL Mamo, V Lam, SS Dhaliwal, C Giles, D Nelson, R Takechi (2015) Blood-brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment. *Immunity & Ageing* vol. 12, pp. 2.
- 12 Evans ML, E Gichana, Y Zhou, MR Chapman (2018) Bacterial amyloids. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* vol. 1779, pp. 267-288.
- 13 Gareau MG (2014) Microbiota-gut-brain axis and cognitive function. *Advances in experimental medicine and biology* vol. 817, pp. 357-371.
- 14 Gareau MG, E Wine, DM Rodrigues, JH Cho, MT Whary, DJ Philpott, G Macqueen, PM Sherman (2011) Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* vol. 60, pp. 307-317.
- 15 Gavini F, C Cayuela, J-M Antoine, C Lecoq, B Lefebvre, M J-M, C Neut (2001) Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of three different (children, adults, elderly) age groups. *Microb Ecol Health Dis* vol. 13, pp. 40-45.
- 16 Harach T, N Marungruang, N Duthilleul, V Cheatham, KD Mc Coy, G Frisoni, JJ Neher, F Fak, M Jucker, T Lasser, T Bolmont (2017) Reduction of abeta amyloid pathology in appsl1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci Rep* vol. 7, pp. 41802.
- 17 Hauss-Wegrzyniak B, MA Lynch, PD Vraniak, GL Wenk (2002) Chronic brain inflammation results in cell loss in the entorhinal cortex and impaired ltp in perforant path-granule cell synapses. *Experimental neurology* vol. 176, pp. 336-341.
- 18 Hauss-Wegrzyniak B, GL Wenk (2002) Beta-amyloid deposition in the brains of rats chronically infused with thiorphan or lipopolysaccharide: The role of ascorbic acid in the vehicle. *Neuroscience letters* vol. 322, pp. 75-78.

- 19 He F, AC Ouwehand, E Isolauri, M Hosoda, Y Benno, S Salminen (2001) Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Current microbiology* vol. 43, pp. 351-354.
- 20 Hopkins MJ, GT Macfarlane (2002) Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *Journal of medical microbiology* vol. 51, pp. 448-454.
- 21 Hufnagel DA, C Tükel, MR Chapman (2013) Disease to dirt: The biology of microbial amyloids. *PLoS pathogens* vol. 9, pp. e1003740.
- 22 Huttenhower C. GD, Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T., et al., and White O. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* vol. 486, pp. 207-214.
- 23 Jaeger LB, S Dohgu, R Sultana, JL Lynch, JB Owen, MA Erickson, GN Shah, TO Price, MA Fleegal-Demotta, DA But-terfield, WA Banks (2009) Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: A mechanism for inflammation in the progression of alzheimer's disease. *Brain, behavior, and immunity* vol. 23, pp. 507-517.
- 24 Jiang C, G Li, P Huang, Z Liu, B Zhao (2017) The gut microbiota and alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 58, pp. 1-15.
- 25 Junges VM, VE Closs, GM Nogueira, MG V Gottlieb (2018) Crosstalk between gut microbiota and the central nervous system: A focus for alzheimer's disease. *Current Alzheimer research* vol.
- 26 Kahn MS, D Kranjac, CA Alonzo, JH Haase, RO Cedillos, KA McLinden, GW Boehm, MJ Chumley (2012) Prolonged el-levation in hippocampal abeta and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse. *Behavioural brain research* vol. 229, pp. 176-184.
- 27 LaFerla FM, KN Green, S Oddo (2007) Intracellular amyloid-beta in alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* vol. 8, pp. 499-509.
- 28 Larroya-Garcia A, D Navas-Carrillo, E Orenes-Pinero (2018) Impact of gut microbiota on neurological diseases: Diet com-position and novel treatments. *Critical reviews in food science and nutrition* vol., pp. 1-15.
- 29 Layton A, L McKay, D Williams, V Garrett, R Gentry, G Saylor (2006) Development of bacteroides 16s rRNA gene taqman-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and environmental microbiology* vol. 72, pp. 4214-4224.
- 30 Liang S, T Wang, X Hu, J Luo, W Li, X Wu, Y Duan, F Jin (2015) Administration of *Lactobacillus helveticus* ns8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience* vol. 310, pp. 561-577.
- 31 Luo J, T Wang, S Liang, X Hu, W Li, F Jin (2014) Ingestion of *Lactobacillus* strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat. *Science China Life sciences* vol. 57, pp. 327-335.
- 32 Mariat D, O Firmesse, F Levenez, V Guimaraes, H Sokol, J Dore, G Corthier, JP Furet (2009) The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology* vol. 9, pp. 123.
- 33 Michalski B, MM Corrada, CH Kawas, M Fahnstock (2015) Brain-derived neurotrophic factor and *trkb* expression in the "oldest-old," the 90+ study: Correlation with cognitive status and levels of soluble amyloid-beta. *Neurobiol Aging* vol. 36, pp. 3130-3139.
- 34 Moloney RD, AC Johnson, SM O'Mahony, TG Dinan, B Greenwood-Van Meerveld, JF Cryan (2016) Stress and the micro-biota-gut-brain axis in visceral pain: Relevance to irritable bowel syndrome. *CNS neuroscience & therapeutics* vol. 22, pp. 102-117.
- 35 Nagpal R, R Mainali, S Ahmadi, S Wang, R Singh, K Kavanagh, DW Kitzman, A Kushugulova, F Marotta, H Yadav (2018a) Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging* vol. 4, pp. 267-285.
- 36 Nagpal R, R Mainali, S Ahmadi, S Wang, R Singh, K Kavanagh, DW Kitzman, A Kushugulova, F Marotta, H Yadav (2018b) Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging* vol. 4, pp. 267-285.
- 37 Neufeld KM, N Kang, J Bienenstock, JA Foster (2011) Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* vol. 23, pp. 255-264, e119.
- 38 Nishimori JH, TN Newman, GO Oppong, GJ Rapsinski, J-H Yen, SG Biesecker, RP Wilson, BP Butler, MG Winter, RM Tsohis, D Ganea, Ç Tükel (2012) Microbial amyloids induce interleukin 17a (il-17a) and il-22 responses via toll-like receptor 2 acti-vation in the intestinal mucosa. *Infection and Immunity* vol. 80, pp. 4398-4408.
- 39 Ohsawa K, N Uchida, K Ohki, Y Nakamura, H Yokogoshi (2015) *Lactobacillus helveticus*-fermented milk improves learn-ing and memory in mice. *Nutritional neuroscience* vol. 18, pp. 232-240.
- 40 Panegyres PK, HY Chen (2013) Differences between early and late onset alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis* vol. 2, pp. 300-306.
- 41 Panegyres PK, HY Chen (2014) Early-onset alzheimer's disease: A global cross-sectional analysis. *Eur J Neurol* vol.
- 42 Perriard G, A Mathias, L Enz, M Canales, M Schluep, M Gentner, N Schaaeren-Wiemers, RA Du Pasquier (2015) Interleu-kin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *Journal of Neuroinflammation* vol. 12, pp. 119.
- 43 Petra AI, S Panagiotidou, E Hatziagelaki, JM Stewart, P Conti, TC Theoharides (2015) Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clinical therapeutics* vol. 37, pp. 984-995.
- 44 Prince M, G-C Ali, M Guerchet, AM Prina, E Albanese, Y-T Wu (2016) Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimer's Research & Therapy* vol. 8, pp. 23.
- 45 Prince M. AE, Guerchet M., Prina M. 2014. World alzheimer report 2014. Dementia and risk reduction. *Alzheimer's Disease International*, London.
- 46 Qin J, R Li, J Raes, M Arumugam, KS Burgdorf, C Manichanh, T Nielsen, N Pons, F Levenez, T Yamada, DR Mende, J Li, J Xu, S Li, D Li, J Cao, B Wang, H Liang, H Zheng, Y Xie, J Tap, P Lepage, M Bertalan, JM Batto, T Hansen, D Le Paslier, A Linneberg, HB Nielsen, E Pelletier, P Renault, T Sicheritz-Ponten, K Turner, H Zhu, C Yu, S Li, M Jian, Y Zhou, Y Li, X Zhang, S

- Li, N Qin, H Yang, J Wang, S Brunak, J Dore, F Guarner, K Kristiansen, O Pedersen, J Parkhill, J Weissenbach, P Bork, SD Ehrlich, J Wang (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* vol. 464, pp. 59-65.
- 47 Rapsinski GJ, MA Wynosky-Dolfi, GO Oppong, SA Tursi, RP Wilson, IE Brodsky, C Tukul (2015) Toll-like receptor 2 and nlrp3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect Immun* vol. 83, pp. 693-701.
- 48 Salazar N, L Valdes-Varela, S Gonzalez, M Gueimonde, CG de Los Reyes-Gavilan (2017) Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut microbes* vol. 8, pp. 82-97.
- 49 Satokari R, R Rantanen, I Pitka, S Salminen 2010 Probiotics and prebiotics in the elderly individuals. Pages 341–353 in S Cho, E Finocchiaro eds. *Handbook of prebiotics and probiotics ingredients – health benefits and food applications* CRC Press, Boca Raton Taylor and Francis
- 50 Savignac HM, M Tramullas, B Kiely, TG Dinan, JF Cryan (2015) Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural brain research* vol. 287, pp. 59-72.
- 51 Schwartz K, BR Boles (2013) Microbial amyloids--functions and interactions within the host. *Current opinion in microbiology* vol. 16, pp. 93-99.
- 52 Strandwitz P (2018) Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research* vol. 1693, pp. 128-133.
- 53 Sun J, S Zhang, X Zhang, X Zhang, H Dong, Y Qian (2015) Il-17a is implicated in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment in aged rats via microglial activation. *Journal of Neuroinflammation* vol. 12, pp. 165.
- 54 Tasnim N, N Abulizi, J Pither, MM Hart, DL Gibson (2017) Linking the gut microbial ecosystem with the environment: Does gut health depend on where we live? *Frontiers in Microbiology* vol. 8, pp. 1935.
- 55 Tran L, B Greenwood-Van Meerveld (2013) Age-associated remodeling of the intestinal epithelial barrier. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* vol. 68, pp. 1045-1056.
- 56 van Tongeren SP, JP Slaets, HJ Harmsen, GW Welling (2005) Fecal microbiota composition and frailty. *Applied and environmental microbiology* vol. 71, pp. 6438-6442.
- 57 Vogt NM, RL Kerby, KA Dill-McFarland, SJ Harding, AP Merluzzi, SC Johnson, CM Carlsson, S Asthana, H Zetterberg, K Blennow, BB Bendlin, FE Rey (2017) Gut microbiome alterations in alzheimer's disease. *Scientific Reports* vol. 7, pp. 13537.
- 58 Wang T, X Hu, S Liang, W Li, X Wu, L Wang, F Jin (2015) *Lactobacillus fermentum* ns9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats. *Beneficial microbes* vol. 6, pp. 707-717.
- 59 Westfall S, N Lomis, I Kahouli, SY Dia, SP Singh, S Prakash (2017) Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: Deciphering the gut brain axis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 74, pp. 3769-3787.
- 60 Westmark CJ (2013) What's happening at synapses? The role of amyloid beta-protein precursor and beta-amyloid in neurological disorders. *Molecular psychiatry* vol. 18, pp. 425-434.
- 61 William CM, ML Andermann, GJ Goldey, DK Roumis, RC Reid, CJ Shatz, MW Albers, MP Frosch, BT Hyman (2012) Synaptic plasticity defect following visual deprivation in alzheimer's disease model transgenic mice. *J Neurosci* vol. 32, pp. 8004-8011.
- 62 Woodmansey EJ, ME McMurdo, GT Macfarlane, S Macfarlane (2004) Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Applied and environmental microbiology* vol. 70, pp. 6113-6122.
- 63 Zhan X, B Stamova, FR Sharp (2018) Lipopolysaccharide associates with amyloid plaques, neurons and oligodendrocytes in alzheimer's disease brain: A review. *Frontiers in aging neuroscience* vol. 10, pp. 42.
- 64 Zhang R, RG Miller, R Gascon, S Champion, J Katz, M Lancero, A Narvaez, R Honrada, D Ruvalcaba, MS McGrath (2009) Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sals). *J Neuroimmunol* vol. 206, pp. 121-124.
- 65 Zhao Y, V Jaber, WJ Lukiw (2017) Secretory products of the human gi tract microbiome and their potential impact on alzheimer's disease (ad): Detection of lipopolysaccharide (lps) in ad hippocampus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 7, pp. 318.
- 66 Zhao Y, WJ Lukiw (2018) Bacteroidetes neurotoxins and inflammatory neurodegeneration. *Molecular neurobiology* vol. 8, pp. 53829-53838.
- 67 Zhu X, Y Han, J Du, R Liu, K Jin, W Yi (2017) Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. *Oncotarget* vol. 8, pp. 53829-53838.
- 68 Zhuang ZQ, LL Shen, WW Li, X Fu, F Zeng, L Gui, Y Lu, M Cai, C Zhu, YL Tan, P Zheng, HY Li, J Zhu, HD Zhou, XL Bu, YJ Wang (2018) Gut microbiota is altered in patients with alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* vol. 63, pp. 1337-1346.

**Кайырманова Г.К.¹, Ернарарова А.К.², Тапешова Ш.Ж.³,
Дарменкулова Ж.Б.⁴, Магмияев Р.Б.⁵, Жубанова А.А.⁶**

¹e-mail: kaiyrman@mail.ru

²e-mail: aliya.yernazarova@gmail.com

³e-mail: tapesnova@bk.ru

⁴НИИ проблем экологии, e-mail: darmenkulova-1993@mail.ru

⁵НИИ проблем экологии, e-mail: ratbek@hotmail.com

⁶e-mail: azhar_1941@mail.ru

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ТЕРМОФИЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ НЕФТЕПЛАСТОВЫХ ВОД МЕСТОРОЖДЕНИЯ «АКИНГЕН»

В статье дана количественная и качественная микробиологическая характеристики нефтепластовых вод месторождения «Акинген». Целью настоящей работы является изучение биоразнообразия термофильной микрофлоры пластовых вод. Микроорганизмы нефтепластовых вод, адаптированные к экстремальным условиям нефтепластов, являются перспективными объектами для разработки микробиологических методов увеличения нефтеотдачи пластов, основанных на способности микроорганизмов вытеснять нефть. В работе использованы традиционные микробиологические методы изучения микроорганизмов. В ходе исследований выделены 14 аэробных и анаэробных термофильных культур микроорганизмов и идентифицированы до родовой принадлежности, так 12 культур микроорганизмов отнесены к р. *Pseudomonas* (T1, T2, T3, T4, T5, T6, D1, D2, D4, D5, D6, D7), 1 как представитель р. *Bacillus* (D8) и 1 – к сульфатредуцирующим микроорганизмам (D9). Установлено, что аэробные микроорганизмы данных нефтепластовых вод доминируют над анаэробными микроорганизмами и составляют $96,1 \times 10^8$ КОЕ/мл, тогда как количество анаэробных микроорганизмов – 14×10^3 КОЕ/мл. Выявлено, что в нефтепластовых водах содержатся следующие группы микроорганизмов: псевдомонады, бациллы и сульфатредуцирующие микроорганизмы. Показано, что нефтепластовая вода месторождения «Акинген» имеет показатель pH, равный 6,34. Выделенные микроорганизмы требуют дальнейшего изучения целевых свойств для разработки биотехнологических способов повышения нефтеотдачи пластов.

Ключевые слова: месторождение «Акинген», нефтепластовая вода, термофилы, «нефтеотрицательные» микроорганизмы, культуральные свойства.

**Kaiyrmanova G.K.¹, Yernazarova A.K.², Tapesnova Sh.Zh.³,
Darmenkulova Zh.B.⁴, Magmiyev R.B.⁵, Zhubanova A.A.⁶**

¹e-mail: kaiyrman@mail.ru

²e-mail: aliya.yernazarova@gmail.com

³e-mail: tapesnova@bk.ru

⁴Scientific Research Institute of Ecology Problems, e-mail: darmenkulova-1993@mail.ru

⁵Scientific Research Institute of Ecology Problems, e-mail: ratbek@hotmail.com

⁶e-mail: azhar_1941@mail.ru

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Biodiversity of thermophilic microflora of oil-bearing waters of the Akingen field

The article provides the quantitative and qualitative microbiological characteristics of the reservoir waters of the Akingen deposit. The purpose of this work is to study the biodiversity of thermophilic microflora of formation waters. Microorganisms of petroleum waters, adapted to the extreme condi-

tions of petroleum plasters, are promising targets for the development of microbiological methods of enhanced oil recovery based on the ability of microorganisms to displace oil. The work used traditional microbiological methods for the study of microorganisms. During the study, 14 aerobic and anaerobic thermophilic cultures of microorganisms with related affiliation were identified and identified; therefore, 12 cultures of microorganisms were classified as *Pseudomonas* (T1, T2, T3, T4, T5, T6, D1, D2, D4, D5, D6, D7), 1 as a representative of the genus *Bacillus* (D8) and 1 – sulfate-reducing microorganisms (D9). It has been established that aerobic microorganisms of these reservoir waters dominate over anaerobic microorganisms and constitute 96.1×10^8 CFU/ml, whereas the number of anaerobic microorganisms is 14×10^3 CFU/ml. It was revealed that the following groups of microorganisms are contained in petroleum waters: pseudomonads, bacilli, and sulphate-reducing microorganisms. It was shown that the oil in the Akingen field has a pH of 6.34. Isolated microorganisms require further study of target properties for the development of biotechnological methods of enhanced oil recovery.

Key words: “Akingen” deposits, oil-bearing water, thermophiles, “oil-negative” microorganisms, cultural properties.

Қайырманова Г.К.¹, Ерназарова А.К.², Тапешова Ш.Ж.³,
Дарменқұлова Ж.Б.⁴, Магмияев Р.Б.⁵, Жұбанова А.А.⁶

¹e-mail: kaiyrman@mail.ru

²e-mail: aliya.yernazarova@gmail.com

³e-mail: tapesnova@bk.ru

⁴Scientific Research Institute of Ecology Problems, e-mail: darmenkulova-1993@mail.ru

⁵Scientific Research Institute of Ecology Problems, e-mail: ratbek@hotmail.com

⁶e-mail: azhar_1941@mail.ru

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

«Ақінген» мұнай кенорны пласт суларының термофильді микрофлорасының биоалуантүрлілігі

Мақалада «Ақінген» мұнай кен орны пласт суларының микробиологиялық сандық және сапалық сипаттамалары берілген. Жұмыстың мақсаты мұнай пласт суларының термофильді микрофлорасының биоалуантүрлілігін зерттеу. Пласт суларының экстремальды жағдайларына бейімделген мұнай пласт микроорганизмдері, пласттардан мұнай шығаруды жоғарылатуда микробиологиялық әдістерді өңдеуде, микроорганизмдер мұнай шығару негізінде перспективалық объект болып табылады. Жұмыста микроорганизмдерді зерттеудің дәстүрлі микробиологиялық әдістері қолданылды. Зерттеу барысында 14 дақыл аэробты және анаэробты термофильді микроорганизмдері бөлініп алынды және туысқа дейін идентификацияланды. 12 дақыл микроорганизмдері *Pseudomonas* туысына (T1, T2, T3, T4, T5, T6, D1, D2, D4, D5, D6, D7), *Bacillus* туысына 1 өкіл (D8) және 1 – сульфатредуцирлеуші микроорганизмдеріне жататындығы анықталынды. Бұл мұнай пласт суларында аэробты микроорганизмдер анаэробты микроорганизмдерден басым және $96,1 \times 10^8$ КТБ/мл болса, анаэробты микроорганизмдер саны 14×10^3 КТБ/мл құрайды. Мұнай пласт суларында келесідей микроорганизмдер тобы: псевдомонадтар, бациллалар және сульфатредуцирлеуші микроорганизмдер анықталынды. «Ақінген» мұнай кен орны пласт суының рН көрсеткіші 6,34 болатындығы көрсетілген. Бөлініп алынған микроорганизмдер пласттардан мұнай шығаруды жоғарылатуда биотехнологиялық әдістерін жетілдіруде мақсатты зерттеуді одан әрі талап етеді.

Түйін сөздер: мұнай кенорны «Ақінген», мұнай пласт суы, термофильдер, «мұнай теріс» микроорганизмдер, дақылдық қасиеттері.

Введение

В настоящее время большинство крупных месторождений Казахстана находится на поздней стадии разработки, характеризующейся значительной обводненностью продукции превышающей 80 %. Вместе с тем, большинство месторождений относятся к категории трудно извлекаемых запасов, вследствие сложного геологического строения, низкой проницаемости пластов и повышенной вязкости нефти [1]. Увеличение конечного коэффициента извлечения

нефти только на 1 % сможет обеспечить значительный прирост ежегодной добычи. Поэтому особое значение приобретает возможность прироста запасов нефти за счет внедрения и увеличения новых современных методов нефтедобычи, в частности, методов увеличения нефтеотдачи с применением микроорганизмов [2]. Известно, что микроорганизмы пласта продуцируют газы, кислоты, поверхностно-активные вещества, которые улучшают подвижность нефти [3]. Для разработки микробиологических методов увеличения нефтеотдачи исполь-

зуются представители следующих родов микроорганизмов: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Micrococcus*. [4].

Основные факторы, влияющие на жизнедеятельность микроорганизмов пластовых вод – температура, осмотическое давление (концентрация солей), содержание кислорода и pH окружающей среды [5].

Известно, что продуктивные запасы нефтепластов месторождений Казахстана залегают на глубине 450-3900 м. В связи с наличием потока тепла от ядра Земли к поверхности с глубиной залегания возрастает и температура пластов. Пластовая температура – это температура, под которой находится жидкость или газ, насыщающие породы пласта. Для характеристики пластовой температуры пользуются понятием геометрическая ступень, которая равна 33-34 м глубины и сопровождается повышением температуры на 1^oC после каждой геотермической ступени [6].

На месторождении «Акинген» глубина залегания продуктивных горизонтов 660-682 м до 927 м, начальное пластовое давление 6,2 – 12,8 Мпа, температура 40-48^o C, с минерализацией пластовых вод – 127,1-162,5 г/л. Таким образом, микроорганизмы разрабатываемых нефтепластовых вод относятся к термофильным микроорганизмам, адаптированным к экстремальным условиям давления и высокой концентрации минеральных веществ. Известно, что термофильные бактерии растут при температуре минимум не ниже 35 – 40^o C, выше 42^o C, оптимум 55 – 75^o C [7]. Облигатные термофилы не растут уже при 37^o C, но факультативные формы способны развиваться при 30 – 35^oC и даже при более низкой температуре [8].

Пластовые воды нефтяных месторождений – это неотъемлемая составная часть продукции добывающих скважин, которая обуславливает значительную долю осложнений при добыче и подготовке нефти на промыслах и представляют собой сложные многокомпонентные системы, состоящие из нефти, сопутствующих вод и закачиваемых технических вод [9].

Известно, что в нефтяных пластах широко распространены аэробные и анаэробные микроорганизмы разных физиологически групп, некоторые из которых не только не теряют жизнеспособности, но и остаются активными в пластовых условиях [10]. Распределение бакте-

рий между пластовой водой и нефтью в значительной степени зависит от их физиологических свойств. Так, Хейер и Шварц выделяют микроорганизмы по их отношению к нефти на две группы. Первая группа «нефтеположительные микроорганизмы», они способны переходить из водной среды в безводную углеводородсодержащую среду и размножаться в ней. К этой группе авторы относят представителей родов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* и объясняют указанную способность наличием у них оболочки, содержащей полярные структуры, обогащенные свободными и связанными липидами. Благодаря этому бактерии обладают способностью развиваться в каплях нефти. Ко второй группе относят «нефтеотрицательные микроорганизмы», не переходящие из водной среды при ее контакте с нефтью и окисляющие углеводороды с поверхности. К этой группе отнесены представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Desulfovibrio* [11].

Микроорганизмы нефтяного пласта обладают большим биотехнологическим потенциалом как микроорганизмы, адаптированные к экстремальным условиям нефтепластов и являются перспективными объектами для разработки биотехнологий для микробиологических методов увеличения нефтеотдачи пластов, основанные на способности микроорганизмов образовывать в процессе жизнедеятельности различные метаболиты, способствующие вытеснению нефти из вмещающих пород [12].

Целью настоящего исследования явилось изучение биоразнообразия термофильной микрофлоры нефтепластовых вод нефтяного месторождения «Акинген», расположенного в Атырауской области Западного Казахстана.

Материалы и методы исследования

В качестве исследуемого материала использовался образец нефтепластовой воды, отобранный весной 2018 г. с действующей скважины нефтяного месторождения «Акинген» Западного Казахстана.

Нефтяное месторождение «Акинген» расположено в Атырауской области Западного Казахстана, в 40 км от г. Кульсары. Месторождение открыто в 1980 году, разработка началась 1 сентября 1992 года, на данное время находится в стадии поздней разработки. Глубина залегания продуктивных горизонтов 660-682 м, 927 м,

начальное пластовое давление 6,2 – 12,8 Мпа, температура 40-48° С, плотность нефти 842-905 кг/м³, нефти малосернистые (0,15-0,28 %), малопарафинистые – 0,88 %. Пластовые воды относятся к хлоркальциевому типу, плотностью 1078-1105 кг/м³ и минерализацией 127,1-162,5 г/л [13].

В работе использовались традиционные микробиологические методы исследования микроорганизмов: определение содержания микроорганизмов (метода Коха), культивирование в аэробных и анаэробных условиях, морфо-культуральные свойства микроорганизмов (подвижность, спорообразование методом Пешкова, определение клеточной стенки бактерий – окраска по Граму, экспресс-метод). В качестве питательных сред использовались универсальная среда *Meat Infusion Agar* (МПА) и элективные среды для определения различных физиологических групп микроорганизмов [14]. Для выделения энтеробактерий - *Endo Agar*, *Eijkman Lactose Broth*, для рода *Bacillus* - *Bacillus Agar Base*, для представителей р. *Pseudomonas* - *Pseudomonas Isolation Agar*, для рода *Rhodococcus* – *Actinomycete Isolation Agar* и для клостридий – *Reinforced Clostridial Agar*. Питательные среды стерилизовались при 1 атм. 40 мин [15]. Аэробные и анаэробные микроорганизмы культивировались в различных условиях: аэробы – в стационарных условиях на МПА при температуре 42° С в течении 24-48 часов; анаэробы – в контейнере для анаэробного культивирования на 24 чашек Петри (HiAnaeroBag System) [16]. Бактериологическая чистота выделенных культур бактерий проверялась методом 3-сегментного посева ищущающего штриха [17]. Микроскопическое изучение проведено на световом бинокулярном микроскопе МОТІС В1-220А (Испания) [18]. Идентификацию микроорганизмов проводили

на основании изучения морфологических, тинкториальных и культуральных свойств в соответствии с Определителем бактерий Берджи [19]. Измерение рН среды проводилось потенциометрическим методом на приборе рН-метр С931Р [20].

Экспериментальные исследования выполнены на базе аккредитованной лаборатории НИИ Проблем Экологии по направлению микробиологические исследования (ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009)

Результаты исследований и их обсуждение

Основные виды микроорганизмов, используемых в биотехнологиях увеличения нефтеотдачи пластов, условно подразделяются на 4 типа: УВОБ – углеводородокисляющие бактерии (аэробы); ББ – бродильные бактерии (аэробы и анаэробы); МОБ – метанобразующие бактерии (анаэробы); СББ – сульфатвосстанавливающие бактерии (аэробы) [21]. Кислотность среды, в которой обитают микроорганизмы, оказывает на них большое влияние. Это один из наиболее важных факторов, от которых зависит рост и размножение микроорганизмов, так как он определяет доступность для организма различных веществ и неорганических ионов [22]. Для большинства микроорганизмов оптимальное значение рН – около 7. Очень кислая или очень щелочная реакция среды является лимитирующим фактором роста для микроорганизмов [23].

В связи с чем, в исследуемом образце нефтепластовой воды месторождения «Акинген» определен показатель рН и проведена общая визуальная характеристика. В таблице 1 представлена общая характеристика исследуемой нефтепластовой воды месторождения «Акинген».

Таблица 1 – Характеристика нефтепластовой воды месторождения «Акинген»

№	Проба	Визуальная характеристика	рН
1	Нефтепластовая вода	Двухфазная жидкость, верхний тонкий (1мм) слой – нефть, коричневого цвета, нижняя – вода	6,34±0,31

Как видно, из табличных данных, показатель рН исследуемой нефтепластовой воды равен 6,34±0,31, что относится к слабокислой, ближе к нейтральной среде (рН=4,0-6,5) [24]. Известно, что для высокоминерализованных пластовых

вод показатель рН изменяется от 6-8, так, нефтепластовые воды месторождений: «Жетыбай» – 6,7 (Казахстан) [25], Арланское – 6,5 (Россия) [26]. Водородный показатель рН характеризует активность ионов водорода, многие виды бакте-

рий растут в относительно узком интервале рН, а большинство из них – при значениях рН, близких к 7 [27].

Далее было проведено количественное и качественное микробиологическое исследование нефтепластовых вод месторождений «Акинген» определено содержание термофильных аэробных и анаэробных микроорганизмов при температуре 42 °С.

В таблице 2 представлены результаты изучения содержания термофильных аэробных и анаэробных микроорганизмов нефтепластовых вод месторождений «Акинген».

В ходе изучения общего количества термофильных микроорганизмов нефтепластовых вод месторождений «Акинген» выявлено, что общее количество аэробных и анаэробных микроорганизмов (ОМЧ) составило $96,1 \times 10^8$ КОЕ/мл и 14×10^3 КОЕ/мл, соответственно. В процессах превращения веществ (кругово-

рот) экологическое значение имеют только те микроорганизмы, которые многочисленны и проявляют активную жизнедеятельность [28]. Для бактерий в качестве условного критерия численности принята величина не менее 1 млн. на 1 г субстрата, т.е. только при такой численности они могут иметь существенное экологическое значение [29]. Изучение общего количества клеток аэробных и анаэробных микроорганизмов нефтепластовых вод месторождения «Акинген» четко показывает, что аэробные микроорганизмы ($96,1 \times 10^8$ КОЕ/мл) этой экосистемы имеют существенное экологическое значение для данной экосистемы, т.е. многочисленны (превышают 1 млн. на 1 мл субстрата) и проявляют активную жизнедеятельность. Известно, в разрабатываемых нефтяных пластах анаэробные процессы протекают медленно, более существенна аэробно-анаэробная трансформация нефти [30].

Таблица 2 – Содержание термофильных аэробных и анаэробных микроорганизмов нефтепластовых вод месторождений «Акинген», КОЕ/мл

№	Проба	Содержание микроорганизмов, КОЕ/мл	
		Аэробы	Анаэробы
1	Нефтепластовые воды	$96,1 \times 10^8 \pm 4,1 \times 10^8$	$14 \times 10^3 \pm 0,6 \times 10^3$

Распределение углеводородокисляющих микроорганизмов, разных таксонов между водой и нефтью зависит от их особенностей, так, в силу различной степени гидрофобности клеточных стенок «нефтеотрицательные микроорганизмы», обладая более гидрофильной клеточной стенкой приурочены в основном к водной фазе, т.е. развитие микроорганизмов в пласте происходит в зоне водонефтяного контакта, где водная фаза соприкасается с углеводородным субстратом.

Далее, для образца нефтепластовой воды проведены исследования на наличие представителей следующих родов микроорганизмов: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* и сульфатредуцирующих микроорганизмов. Следует отметить, что физиологическая группа микроорганизмов – это объединение микроорганизмов в одну группу по одному физиологическому признаку, но они могут иметь различное происхождение [31]. В таблице 3 представлены результаты качественной микробиологической характеристики нефтепластовых вод.

Как видно, из табличных данных, в исследуемой пробе в аэробных и анаэробных условиях определены представители следующих «нефтеотрицательных» групп микроорганизмов: *Pseudomonas*, *Bacillus* и сульфатредуцирующих микроорганизмов. Максимальное количество микроорганизмов представлены псевдомонадами (10×10^6 КОЕ/мл), значительно меньше содержание клеток *Bacillus* ($1,3 \times 10^1$ КОЕ/мл) и сульфатредуцирующих микроорганизмов ($1,9 \times 10^1$ КОЕ/мл). Известно, что в разрабатываемых нефтяных пластах присутствуют аллохтонные бактерии, поступающие с нагнетаемой водой и аборигенная микрофлора [32]. В нашем случае, присутствие в большом количестве аэробных псевдомонад показывает об активном газообмене пластов с поверхностью.

В результате проведенных исследований нефтепластовой воды месторождения «Акинген» выделены, даны названия и изучены морфологические, тинкториальные и культуральные свойства 14-и культур микроорганизмов (таблица 4).

Таблица 3 – Качественная микробиологическая характеристика нефтепластовых вод месторождений «Акинген», КОЕ/мл

№	Физиологические группы микроорганизмов	Содержание термофильных микроорганизмов, КОЕ/мл
1	<i>Rhodococcus</i>	Не выявлены
2	<i>Pseudomonas</i>	10x10 ⁶ ±
3	<i>Bacillus</i>	1,3 x10 ¹ ±
4	<i>Enterobacter</i>	Не выявлены
5	Сульфатредуцирующие микроорганизмы	1,9x10 ¹ ±
6	<i>Clostridium</i>	Не выявлены

Таблица 4 – Морфо-культуральное изучение микрофлоры нефтепластовой воды месторождения «Акинген»

№	Название микроорганизмов	Условия культивирования, t 42 °C	Форма и соединение клеток	Окраска по Граму	Грам Экспресс	Подвижность	Спорообразование	Выделение пигмента в среду
1	T1	аэробы	моно-, диплобактерии	Г-	Г-	+	-	сине-зеленый
2	T2	аэробы	монобактерии	Г-	Г-	+	-	зеленый
3	T3	аэробы	моно-, диплобактерии	Г-	Г-	+	-	зеленый
4	T4	аэробы	моно-, диплобактерии	Г-	Г-	+	-	зеленый
5	T5	аэробы	моно-, диплобактерии	Г-	Г-	+	-	Зеленый
6	T6	аэробы	моно-, диплобактерии	Г-	Г-	+	-	Зеленый
7	D1	аэробы	монобактерии	Г-	Г-	+	-	-
8	D2	аэробы	монобактерии	Г-	Г-	+	-	-
9	D4	аэробы	диплобактерии	Г-	Г-	+	-	-
10	D5	аэробы	диплобактерии	Г-	Г-	+	-	Зеленый
11	D6	аэробы	монобактерии	Г-	Г-	+	-	Зеленый
12	D7	аэробы	монобактерии	Г-	Г-	+	-	-
13	D8	анаэробы	моно-, диплобактерии	Г+	Г+	+	+	-
14	D9	анаэробы	моно-, диплобактерии	Г+	Г+	+	-	-

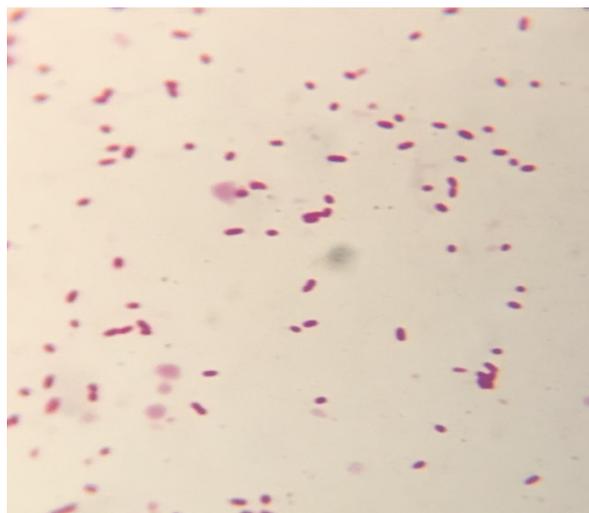
Примечание: «+»- признак присутствует, «-»-признак отсутствует,
«Г+» – Грамположительный; «Г-» – Грамотрицательный

Как видно, из 14-и термофильных культур микроорганизмов, выделенных из нефтепластовых вод месторождения «Акинген»: 12 культур – грамотрицательные бактерии, выделенные в аэробных (T1, T2, T3, T4, T5, T6, D1, D2, D4, D5, D6, D7) и 2 – грамположительные культуры в строгих анаэробных условиях (D8, D9). Клетки всех культур подвижны, споры не образуют, кроме клеток культуры D8.

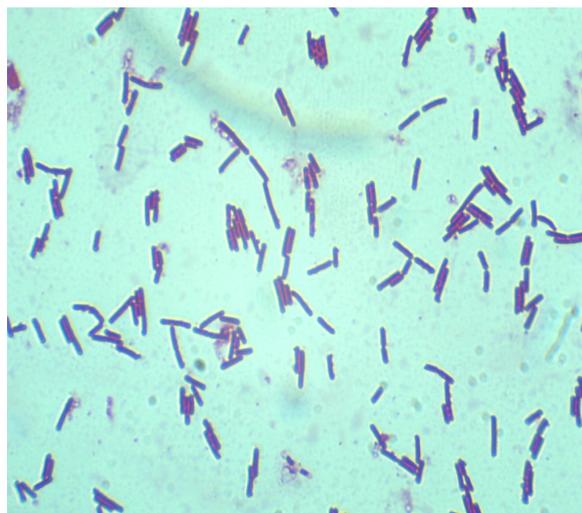
Микроскопическое изучение клеточного строения культур показало, что все культуры бактерий представлены моно- и диплобактериями. На рисунке 1 показаны микрофотогра-

фии клеток культур T6 и D8, как видно, клетки культуры T6 представлены, в основном, одиночными редко попарно расположенными грамотрицательными палочками, тогда как, клеточное строение D8 представлено грамположительными, в большинстве, дипло- реже монобактериями.

Следует отметить, что характерной особенностью 8-и из 14-и культур при культивировании на различных средах (T1, T2, T3, T4, T5, T6, D5, D6) является выделение в среду флуоресцирующих сине-зеленых и зеленых пигментов (Рис. 2).



T6 (Г-)



D8 (Г+)

Рисунок 1 – T6 (Г-) грамотрицательные и D8 (Г+) грамположительные микроорганизмы нефтепластовых вод

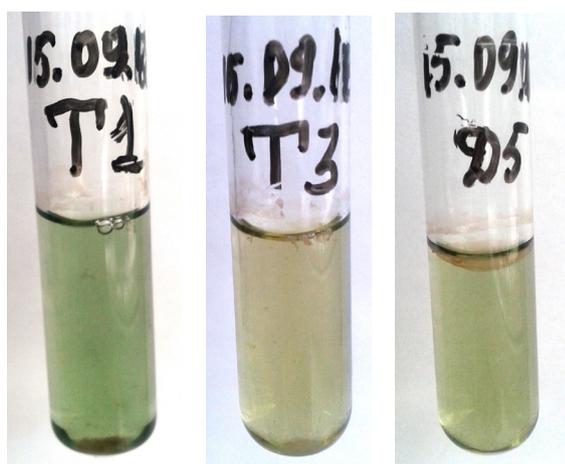


Рисунок 2 – Рост микроорганизмов (T1, T3, D5) в жидкой среде МПБ и образование пигментов

Известно, что клетки *P.aeruginosa* могут продуцировать водорастворимые пигменты, в том числе, такие как сине-зеленый (пиоцианин) и флюоресцин (пиовердин) зеленого цвета [33].

Таким образом, результаты изучения основных морфолого-культуральных признаков 14-и микроорганизмов, выделенных из нефтепластовых вод месторождения «Акинген», позволили нам идентифицировать их до родовой принадлежности, так, 12 культур микроорганизмов отнесены к р. *Pseudomonas* (T1, T2, T3, T4, T5, T6, D1, D2, D4, D5, D6, D7), 1 как представитель р. *Bacillus* (D8) и 1 – к сульфатредуцирующим микроорганизмам (D9).

Заключение

В результате проведенных микробиологических исследований нефтепластовых вод производственной скважины нефтяного месторождения «Акинген», расположенного в Атырауской области Западного Казахстана сделаны следующие выводы:

Показано, что нефтепластовые воды действующей скважины месторождения «Акинген» имеют слабокислый ближе к нейтральному показатель рН равный $6,34 \pm 0,31$ единиц;

Выявлено, что в нефтепластовых водах содержатся следующие «нефтеотрицательные» группы микроорганизмов: псевдомонады, бациллы и сульфатредуцирующие микроорганизмы;

Выделены 14 термофильных культур микроорганизмов;

Результаты изучения основных морфолого-культуральных признаков 14-и микроорганизмов, выделенных из нефтепластовых вод, позволили нам идентифицировать их до родовой принадлежности, так, 12 культур микроорганизмов отнесены к р. *Pseudomonas* (T1, T2, T3, T4, T5, T6, D1, D2, D4, D5, D6, D7), 1 как представитель р. *Bacillus* (D8) и 1 – к сульфатредуцирующим микроорганизмам (D9).

Данные культуры требуют дальнейшего изучения как перспективные объекты для разработки микробиологических методов повышения нефтеотдачи разработанных нефтепластов.

Литература

- 1 Кан С.М., Берстенов С.В. К технологии извлечение лития из пластовых вод месторождений нефти и газа южного Мангышлака // Вестник Национальной Академии Наук.– 2017. – Т. 5. – С. 149-155
- 2 Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н., Розанова Е.П., Ибатуллин Р.Р. Использование микроорганизмов в биотехнологии повышения нефтеизвлечения // Микробиология. – 2004. – Т. 73 (№5). – С. 687-697
- 3 Назина Т.Н., Павлова Н.К., Татаркин Ю.В., Шестакова Н.М., Бабич Т.Л. Микроорганизмы карбонатной нефтяной залежи 302 Ромашкинского месторождения и их биотехнологической потенциал // Микробиология.2013. Т. 82, №2. с 191-202.
- 4 Nilsen R.K., Beeder J., Thorstenson T., Torsvik T., Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field water and oil reservoirs // Appl. and Envirom. Microboal. – 1996. – Vol. 62. – P. 1793-1798.
- 5 Odam J.M. The sulfate – reducing bacteria: contemporary Perspectives. – Springer- Verlag: New-York Inc., 1993. – Vol. 16. – 290 p.
- 6 Ягудеев Р.Ш. Опыт-промышленное испытание новой расширяющейся добавки// Новости науки Казахстана, – 2009. – Т. 2. – С. 33-87.
- 7 Beggar, I., Petrisor I.G., Yen T. E. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). Oil Science and Technology. – 2007. – Т. 25. – P.1353-1366
- 8 Yim K.J., Song H.S., Choi J.C., Roh S.W. Thermoproteus thermophiles sp.nov., a hyperthermophilic crenarchaeon isolated from solfataric soil // Int.J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – Vol. 65. – P.2507-2510
- 9 Ismaylov N. M. Mamedyarov M.A. Experience in the development and implementation of ecology biotechnology for enhanced oil recovery in Azerbaijan // Petromicrobiology -2010 All-union Congress, China, Yuly, 28-30, Dalian.
- 10 Francy D.S. Thomas J.M., Raymond R.L., Ward C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria // J. Ind. Microbiol. – 1991. – Vol. 8. – P. 237-246.
- 11 Nazina T. N., Sokolova D. S., Grigoryan A. A. et al., Geobacillus jurassicus sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the Geobacillus species // Systematic and Applied Microbiology.– 2005. – Vol. 28. – P. 43-53.
- 12 Havemann G.D., Clement B.G., Kozicki K.M., Meling T., Beeder J., Sunde E. New Microbial Method Shows Promise in EOR // JPT – 2015. – March. – P. 32-35.
- 13 Нефтяная энциклопедия Казахстана, Алматы – 2005. С. 237
- 14 Muslimov R., Kandaurova G., Wagner M. et al. Microbial Improved Oil Recovery in Carbonate Reservoirs – Preparation of Pilot Project in the Oil Field Romashkino, Republic of Tatarstan (CIS) / -Proc. of VII European Symposium on Enhanced Oil Recovery. -Moscow, – 1993. – P. 496-506.
- 15 Venkata R. K., Chaiyulu N.C., Karanth N.I. Mathematical Model for the Production of Bio-surfactants by Pseudomonas aeruginosa CFTR-6: Production of Biomass // J. of Chemical Technology and Biotechnology. -1991. -Vol. 51. -№ 4. – P. 525-538.
- 16 Watanabe Y. Review on microbial ecology in the deep subterranean environment // Quart. Abstr. / Cent. Res. Inst. Elec. Power Ind. – 1997. –Vol. 77. –P. 11-12.
- 17 Практикум по микробиологии / Под ред. А.И. Нетрусов – М.: Академия, 2005. – 603с.
- 18 Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л. Образование поверхностно-активных веществ аэробными бактериями, выделенными из нефтяных пластов // Актуальные аспекты современной микробиологии: VIII молодежная школа- конференция с международным участием, Инс-т микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва, 29-31 окт. 2012 г.: тезисы. – М.: МАКСПресс, 2012. С.160-163.
- 19 Определитель бактерий Берджи: в 2 томах / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – 9е издание. – М.: Мир, 1997. – 652 с.78.
- 20 Tanner R.S., Undegbunam E.O., McInemey M.J., Knapp R.M. Microbially Enhanced Oil Recovery from Carbonate Reservoirs / Geomicrobiology J., 1991. – Vol. 9. – №4. – p.69-195.
- 21 Киреева Н.А. Микробиологические процессы в нефте-загрязнённых почвах. Дисс. д-ра.биол.наук / Башкирский гос. ун-т. Уфа, 1996. – 329 с. 72-93.
- 22 Pelger J.W. Microbial Enhanced Oil Recovery Treatment and Wellbore Stimulation Using Microorganisms to Control Paraffin, Emulsion, Corrosion and Scale Formation / Microbial Enhanc. Oil Recov. -Recent Adv.: Proc. Int. Conf., Norman., Okla., 1990. – Amsterdam, 1991. – p. 451-466.
- 23 Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология .-1996- Т.32, № 6- С.579-585.
- 24 Bryant R.S. et al. Microbial Enhanced Waterflooding: Mink Unit Project / SPE Reservoir Engineering.- 1990, 2. -Vol.5. – №1. – P. 9-13
- 25 Кайырманова Г.К., Мустапаева Ж.О., Ерназарова А.К., Аманғалиқызы А. Эколого – функциональные свойства аборигенных микроорганизмов нефтепластов // Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal) Biologia-2016. – Vol. 7. – P. 145-149.
- 26 Еремин Н. А., Золотухин А.В., Назарова Л.К., Черников О. А., Выбор метода воздействия на нефтяную залежь / Под ред. Мищенко ИТ. -Учебн. Пособие. – М.: ГАНГ, 1995-190 с. 83-91 стр.
- 27 Cusack F., Lappin-Scott H.M., Costerton J.W. Bacteria Can Plug Waterflood injection wells / Oil and Gas J., 1987. – № 45. – p. 59-64.

- 28 Мамедьянов М.А., Исмаилов Н.М. Разработка и применение микробиологических методов повышения нефтеотдачи в Азербайджане // Нефтегазовые технологии. – 2011. – Т.11. – С. 23-27.
- 29 Громов Б. В. Экология бактерий. Л.: Изд-во ЛГУ, 1989 – 246 стр. с.47-49
- 30 Милехина Е.И., Борзенков И.А., Звягинцева И.С. Свойства углеводородокисляющей бактерии *Rhodococcus erythropolis*, изолированной из нефтяного месторождения // Микробиология. – 1998. – Т.67. – №3. – С. 328-332.
- 31 Боронин П.А., Севастьянов А.А., Тюменский Государственный Нефтегазовый университет, Использование модели дикстра и парсонса для оценки эффективности волнового воздействия на пласт. – М.: Изд-во «Нефть и газ», 2014. – С. 34-36.
- 32 Chang Hong Gao Abdulrazag Zekri, Khaled El-Tarabily. Microbes enhance oil recovery through various mechanisms // Oil and Gas Journal. – 2009. – № 17.– P.39-43.
- 33 Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. под ред. Широкова В.П.; Винница, 2015. – с.83

References

- 1 Beggar I., Petrisor I.G., Yen T.E. (2007) Microbial enhanced oil recovery (MEOR). Oil Science and Technology, vol 25, pp. 1353-1366
- 2 Beliaev S.S., Borzenkov I.A., Nazina T.N., Rozanova E.P., Ibatullin R.R (2004).. Ispolzovanie mikroorganizmov v biotekhnologii povysheniia nefteizvlecheniia [The use of microorganisms in biotechnology to improve oil recovery] // Mikrobiologiya. vol. 73, no.5, pp. 687-697
- 3 Boronin P. A., Sevastianov A. A. (2014) Using model Dykstra and Parsons to assess the efficiency of wave stimulation [Ispolzovanie modeli dikstra i parsonsa dlia osenky effektivnosti volnovogo vozdeistvia na plast]. Izd-vo «Neft i gas», pp. 34 – 36.
- 4 Bryant R.S (1990) et al. Microbial Enhanced Water flooding: Mink Unit Project / SPE Reservoir Engineering, Vol.5, no 1. – pp. 9-13
- 5 Chang Hong Gao Abdulrazag Zekri, Khaled El-Tarabily. (2009). Microbes enhance oil recovery through various mechanisms // Oil and Gas Journal. vol. 17 – August. – pp.39-43.
- 6 Cusack F., Lappin-Scott H.M., Costerton J.W. (1987) Bacteria Can Plug Water flood injection wells / Oil and Gas J. vol. 45. pp. 59-64.
- 7 Edited by Shirobokov V.P. (2015) Medical Microbiology, Virology and Immunology [Pod redaktsiei Shirobokova V.P. Meditsinskaia mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya] Vinnitsa: 856 p.83
- 8 Eremin N. A., Zolotukhin A.V., Nazarova L.K., Chernikov O. A., (1995) Vybora metoda vozdeistvia na neftianuiu zalezhu [The choice of method of influence on the oil reservoir] / Pod red. Mishchenko I.T. -Uchebn. Posobie. – М.: GANG, p 190. pp. 83-91
- 9 Francy D.S. Thomas J.M., Raymond R.L., Ward C.H. (1991) Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria // J. Ind. Microbiol. vol 8, pp. 237-246.
- 10 Gromov B. V. (1989) Ekologiya bakterii. [Bacteria Ecology] L.: Izd-vo LGU, 246 .pp. 47-49
- 11 Havemann G.D., Clement B.G., Kozicki K.M., Meling T., Beeder J., Sunde E. (2015) New Microbial Method Shows Promise in EOR // JPT March. vol 5, pp. 32-35.
- 12 Iagudeev R.Sh. (2009) Opytno-promyshlennoe ispytanie novoi rasshiriaushcheisia dobavki [Pilot test of new expanding additive] // Novosti nauki Kazakhstana, vol 2, pp 33-87.
- 13 Ismaylov N. M., Mamedyarov M.A. (2010) Experience in the development and implementation of ecology biotechnology for enhanced oil recovery in Azerbaijan // Petromicrobiology All-union Congress, China, Yuly, 28-30, Dalian
- 14 Kan S.M., Berstenov S.V. (2017) K tekhnologii izvlechenia litii iz plastovykh vod mestorozhdenii nefi i gaza iuzhnogo Mangyshlaka [To technology extraction of lithium from the reservoir waters of oil and gas fields of the southern Mangyshlak] // Vestnik Natsionalnoi Akademii Nauk. vol.5. pp. 149-155
- 15 Kayyрманова GK, Mustapaeva ZH.O., Yernazarova AK, Amankaligyzy A. (2016) Ecological – functional properties of aboriginal microorganisms of petroleum plastics [Ekologo – funktsionalnye svoystva aborigennykh mikroorganizmov nefteplastov] // Vschodnioevropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal) Biologia-Vol.7. pp 145-149.
- 16 Kireeva H.A. (1996) Mikrobiologicheskie protsessy v nefte-zagiaznennykh pochvakh [Microbiological processes in oil-polluted soils] Diss. d-ra.biol.nauk / Bashkirskii gos. un-t. Ufa. 329. p 72-93
- 17 Koronelli T.V. (1996) Printsipy i metody intensivatsii biologicheskogo razrusheniia uglevodorodov v okruzhaiushchei srede (obzor) [Principles and methods of intensifying the biological destruction of hydrocarbons in the environment] // Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya—vol 32, no 6, pp.579-585.
- 18 Mamedjanov M.A., Ismailov N.M. (2011) Razrabotka i primenenie mikrobiologicheskikh metodov povysheniia nefteotdachi v Azerbaidzhane [The development and application of microbiological methods of enhanced oil recovery in Azerbaijan] // Neftgazovye tekhnologii – vol.11, pp. 23-27
- 19 Milekhina E.I., Borzenkov I.A., Zviagintseva I.S. (1998) Svoystva uglevodorodokisliaiushchei bakterii *Rhodococcus erythropolis*, izolirovannoi iz nefyanogo mestorozhdeniia [Properties of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus erythropolis* isolated from an oil field] // Mikrobiologiya. – Vol.67, no 3. pp. 328-332.
- 20 Muslimov R., Kandaurova G., Wagner M. (1993) et ai. Microbial Improved Oil Recovery in Carbonate Reservoirs – Preparation of Pilot Project in the Oil Field Romashkino, Republic of Tatarstan (CIS) / -Proc. of VII European Symposium on Enhanced Oil Recovery. -Moscow. -pp. 496-506.
- 21 Nazina T. N., Sokolova D. S., Grigoryan A. A. (2005) “*Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. Systematic and Applied Microbiology, vol. 28, pp. 43-53.

- 22 Nazina T.N., Pavlova N.K., Tatarkin Iu.V., Shestakova N.M., Babich T.L.(2013) Mikroorganizmy karbonatnoi neftianoj zalezhi 302 Romashkinskogo mestorozhdeniia i ikh biotekhnologicheskoi potentsial [Microorganisms of carbonate oil deposits of the 302 Romashkinskoye field and their biotechnological potential] // Mikrobiologiya. vol 82, no 2, pp.191-202
- 23 Neftianaia entsiklopediia Kazakhstana, (2005). Almaty, p. 237
- 24 Nilsen R.K., Beeder J., Thorstenson T., Torsvik T., (1996) Distribution of thermophilic marine sulfate reducers in North Sea oil field water and oil reservoirs // Appl. and Envirom. Microboal. vol 5, pp. 1793-1798.
- 25 Odam J.M. (1993) The sulfate – reducing bacteria: contemporary Perspeetives. – Springer- Verlag: New-York Inc., vol. 16, p.290
- 26 Opredelitel bakterii Berdzhii: v 2 tomakh [Detector bacteria Burgii] / pod.red. Dzh. Khoulta, N. Kriga, P. Snita i dr. (1997) 9e izdanie. – M.: Mir,-652 p.78.
- 27 Pelger J.W. (1991) Microbial Enhanced Oil Recovery Treatment and Wellbore Stimulation Using Microorganisms to Control Paraffin, Emulsion, Corrosion and Scale Formation / Microbial Enhanc. Oil Recov. -Recent Adv.: Proc. Int. Conf., Norman., Okla.,-Amsterdam,. -p. 451-466.
- 28 Praktikum po mikrobiologii (2005) / Pod red.A.I. Netrusov – M.: Akademiia, P.603
- 29 Sokolova D.Sh., Babich T.L. (2012) Obrazovanie poverkhnostno-aktivnykh veshchestv aerobnymi bakteriiami, vydelenymi iz neftiannykh plastov [The formation of surfactants by aerobic bacteria isolated from oil reservoirs] // Aktualnye aspekty sovremennoi mikrobiologii: VIII molodezhnaia shkola- konferentsiia s mezhdunarodnym uchastiem, Ins-t mikrobiologii im. S.N. Vinogradskogo RAN, Moskva, 29-31 okt. : tezisy- M.: MAKSPress, pp.160-163.
- 30 Tanner R.S., Undegbunam E.O., McInemey M.J., Knapp R.M. (1991) Microbially Enhanced Oil Recovery from Carbonate Reservoirs / Geomicrobiology J. -Vol. 9, no 4, pp.69-195.
- 31 Venkata R. K., Chaiyulu N.C., Karanth N.I. (1991) Mathematical Model for the Production of Bio-surfactants by Pseudomonas aeruginosa CFTR-6: Production of Biomass // J. of Chemical Technology and Biotechnology, -Vol. 51, no 4, pp. 525-538.
- 32 Watanabe Y. (1997) Review on microbial ecology in the deep subterranean en-viroment // Quart. Abstr. / Cent. Res. Inst. Elec. Power Ind. – No 77. – P. 11-12.
- 33 Yim K.J., Song H.S., Choi J.C., Roh S.W. (2015) Thermoproteus thermophiles sp.nov., a hyperthermophilic crenarchaeon isolated from solfataric soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol.– vol.65, pp. 2507-2510

**Сапарбекова А.А.¹, Муталиева Б.Ж.²,
Джакашева М.А.³, Латиф А.С.⁴**

¹e-mail: almira.saparbekova@mail.ru

²e-mail: mbota@list.ru

³e-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

⁴e-mail: latif-aziz@mail.ru

Южно-Казахстанский государственный университет имени М. Ауэзова,
Казахстан, г. Шымкент

**ИЗВЛЕЧЕНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА
ФЕРМЕНТНЫМ ПРЕПАРАТОМ ПЕКТИНОЛ
F-RKM 0719, ПРОДУЦИРУЕМЫЙ ШТАММОМ
ASPERGILLUS AWAMORI F-RKM 0719**

Ресвератрол природный фитоалексин, обладающий выраженными лечебно-профилактическими свойствами, входит в состав кожуры винограда. Однако, из-за того, что он находится в связанном состоянии, использование его организмом значительно снижена. В связи с чем возникает потребность в использовании ферментных препаратов для извлечения ресвератрола. Целью данного исследования является максимальное извлечение ресвератрола из кожуры винограда.

По мере созревания винограда массовая концентрация ресвератрола увеличивается, и максимальное значение достигается в сорте Каберно Совиньен 467 мг/ дм³. Во всех проведенных экспериментах по извлечению ресвератрола из виноградных выжимок штаммом *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 и ферментным препаратом Пектинол F-RKM 0719 наблюдается увеличение количества выделенного ресвератрола. В опытах с сортом Каберно Совиньен количество ресвератрола максимально и возросло с 392,66 (контрольный образец), при использовании штамма *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 – 497,66, а при извлечении ресвератрола ферментным препаратом Пектинол F-RKM 0719 экстрагировано 699,62 мг/ дм³.

Проведенные исследования доказывают возможность использования сорта винограда Каберно Совиньен и ферментного препарата Пектинол F-RKM 0719, который существенно увеличивает количество извлеченного ресвератрола.

Ключевые слова: ресвератрол, ферментный препарат Пектинол F-RKM 0719, штамм *Aspergillus awamori* F-RKM 0719, ферментированный сок.

Saparbekova A.A.¹, Mutaliyeva B.Zh.²,
Dzhakasheva M.A.³, Latif A.S.⁴

¹e-mail: almira.saparbekova@mail.ru

²e-mail: mbota@list.ru

³e-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

⁴e-mail: latif-aziz@mail.ru

M. Auezov South-Kazakhstan State University, Kazakhstan, Shymkent

**Extraction of resveratrol with the enzyme preparation
Pectinol F-RKM 0719 produced by the strain *Aspergillus awamori* F-RKM 0719**

Resveratrol is natural phytoalexin with pronounced therapeutic and prophylactic properties, it is part of the grape skin composition. However, due to the fact that it is in a bound state, the use of it by organism significantly reduced. Therefore, for the extraction of resveratrol is a need to use the enzyme preparations. The purpose of this study is maximize the recovery of resveratrol from the grape skin.

During ripening of grape, the mass concentration of resveratrol increases, and the maximum value is reached in the Caberno Sauvignan variety – 467 mg / dm³. In all experiments on the extraction of resveratrol from grape squeeze by the strain *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 and the enzyme preparation Pectinol F-RKM 0719 an increase in the quantity of resveratrol is observed. In experiments with Caberno Sauvignan, the amount of resveratrol was maximal and increased from 392.66 control sample, when using the strain *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 – 497.66, and when resveratrol was extracted by the enzyme preparation Pectinol F-RKM 0719 – 699.62 mg / dm³.

Studies have shown the possibility of using the Caberno Sauvienne grape variety and the enzyme preparation Pectinol F-RKM 0719, which significantly increases the amount of extracted resveratrol.

Key words: resveratrol, enzyme preparation Pectinol F-RKM 0719, strain *Aspergillus awamori* F-RKM 0719, fermented juice.

Сапарбекова А.А.¹, Муталиева Б.Ж.²,
Джакашева М.А.³, Латиф А.С.⁴

¹e-mail: almira.saparbekova@mail.ru

²e-mail: mbota@list.ru

³e-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

⁴e-mail: latif-aziz@mail.ru

М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті,
Қазақстан, Шымкент қ.

Ресвератролды *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 штаммы продуцирлейтін ферменттік препарат пектинол F-RKM 0719 арқылы бөліп алу

Ресвератрол терапиялық табиғи фитоалексин және профилактикалық қасиеттері бар жүзім қабығы болып табылады. Осыған байланысты ресвератролды қалпына келтіру үшін ферменттік препараттарды қолдану қажеттілігі бар. Зерттеудің мақсаты жүзім қабығынан ресвератролдың қалпына келуін барынша арттыру.

Жүзім жетілген кезде, ресвератрол концентрациясы артады және бұл көрсеткіш Caberno Sovinen сортында 467 мг / дм³-ге жетеді. Caberno Sovinen сортының жүзім сығындысында (бақылау үлгісі) ресвератролдың ең жоғарғы көрсеткіші 392,66-ге жетсе, *A. awamori* F. RKM 0719 штаммын қолданғанда –449,66, ал Пектинол F-RKM 0719 ферменттік препаратын ресвератролды бөліп алуда қолданғанда бұл көрсеткіш 699,62 мг / дм³-ге жетті. Ферменттелген шырындарда жүзім сығындысын одан әрі пайдаланудың тиімділігі дәлелденді.

Зерттеулер «Caberno Sauvienne» жүзім сортын және ферменттік препаратты Pectinol F-RKM 0719 пайдалану мүмкіндігін көрсетті.

Түйін сөздер: ресвератрол, ферменттерді дайындау Pectinol F-RKM 0719, штамм *Aspergillus awamori* F-RKM 0719, ферменттелген шырын.

Введение

Ресвератрол, входящий в состав кожуры винограда, оказывает положительное влияние на клетки человеческого организма, увеличивая тем самым продолжительность жизни человека и улучшая состояние его здоровья. Ресвератрол тормозит разрастание преджировых клеток, мешая их преобразованию в зрелые жировые клетки, и препятствует накоплению жира. Таким образом, ресвератрол служит профилактикой появления избыточного веса [1]. Ресвератрол природный фитоалексин, выделяемый некоторыми растениями в качестве защитной реакции против паразитов, таких как бактерии и грибы. Исследования проведенные на модельных объектах, доказали противоопухолевое действие ресверотрола, однако его действие ограничено его низкой биодоступностью. Группа исследо-

вателей показали ошоломительный результат, доказывающий способность ресвератрола продлевать срок жизни и улучшает состояние функционирования мозга. Однако, в растительной клетке ресвератрол находится в связанном состоянии, что затрудняет его использование организмом. Извлечение его из комплексных соединений возможно только при использовании ферментных препаратов [2].

На современном этапе для разработки научных основ ферментных технологий для перерабатывающих отраслей агропромышленного комплекса (АПК) является поиск эффективных продуцентов пектиназ, полученных на основе генетических и селекционных методов. Наиболее часто используемые промышленные штаммы-продуценты пектиназ относятся к роду *Aspergillus*, синтезирующие богатый комплекс гидролитических ферментов, обеспечивающих

эффективную деструкцию полимеров растительного и микробного сырья в технологиях производства соков, морсов, экстрактов и биопрепаратов пищевого и кормового назначения [3].

На сегодняшний момент производство пектолитических ферментов составляет около 10% всего мирового производства ферментных препаратов. Пектолитические ферменты имеют большое промышленное значение в различных отраслях биотехнологии: при получении пектинов [4]; при производстве кофе, чая, растительного масла, соков из плодово-ягодного сырья [5]. Пектолитические ферменты играют большую роль в осуществлении физиологических процессов, связанных с разрушением растительных клеточных стенок или модификаций. Огромное значение имеют в производстве натуральных соков, так как они способствуют повышению выхода сока и содержания в нем ароматобразующих, красящих и других экстрактивных веществ [6, 7].

В последние годы во многих странах мира, и в частности, в Казахстане растет потребность в сокодержущих напитках потенциально способных проявлять оздоровительные свойства. Ферментированные соки и напитки являются оптимальной формой пищевого продукта, используемые для обогащения организма человека биологически активными веществами и применяемые для любого контингента потребителей. Для создания новых видов напитков необходимы дополнительные научные данные об их полезности для здоровья. Казахстан имеет все шансы стать одной из ведущих стран в мире в производстве соков и сок содержащих напитков. Этому способствует благоприятный климат и биологический состав почвы. В мире существует не так много стран, климатические условия которых позволяют выращивать значительные урожаи фруктов и плодовоовощной продукции. Этот факт ставит Казахстан в равные условия с государствами, имеющими развитую соковую индустрию, насыщающую собственные рынки и ориентированную на экспорт.

Значительная часть сока плодов и ягод при измельчении отделяется без применения жесткого прессования. При высоких режимах механической переработки сок легко отделяется, но в большинстве случаев его качество снижается с увеличением нагрузки прессования. В связи, с чем актуально обеспечить распад как основной, так и покровной тканей красных плодов для максимального извлечения красящих и ароматических веществ. Также необходимым усло-

вием получения качественных соков является и снижение вязкости сока. Пектиназы широко используются при переработке плодов и ягод для снижения содержания в них пектиновых веществ и низкомолекулярных коллоидов, которые вызывают желатиновую структуру фруктовой мякоти и ее вязкость [8]. Использование ферментативной мацерации фруктовой мякоти при экстракции позволяет увеличить выход соков по сравнению с традиционным процессом механического отжима, получить продукт, легко поддающийся фильтрации, имеющий более высокие органолептические свойства и повышенное содержание витаминов [9]. Применение кислых пектиназ при получении соков, морсов и вин приводит к увеличению содержания экстрактивных и ароматических веществ, мономерных флавоноидов, что влечет к увеличению пищевой ценности продукта [10].

Однако, растительная клетка помимо пектиновых веществ содержит также целлюлозу, гемицеллюлозу и ряд других соединений, и поэтому глубокий гидролиз многокомпонентного растительного сырья возможен лишь при использовании комбинированных препаратов, содержащих ферменты с разной субстратной специфичностью. В связи с чем, подбор и исследование качественного и количественного составов ферментных комплексов гидролаз обеспечивает достижения наивысшей их активности при действии на субстрат, наибольшей скорости деструкции природных биополимеров и, как следствие всего вышеперечисленного максимального выхода биологически активных веществ, в том числе и ресвератрола.

Главную роль в формировании окраски ферментированных напитков, включая натуральные вина, играют фенольные соединения, состав которых формируется в зависимости от сорта винограда [11]. Экстрагирование фенольных, ароматических и других веществ из мезги зависит от степени механического или ферментативного разрушения клеток, содержащих эти вещества, температуры, продолжительность обработки суслу или мезги, условий массообмена в мезге и др.

Ферментные препараты в производстве соков используются с целью повышения выхода сока и содержания в нем ароматобразующих [12], красящих и других экстрактивных веществ; облегчения прессования мезги [13];

Пектиназы были первыми ферментами, которые начали использовать в плодоперерабатывающей промышленности; впервые факт их

использования был зафиксирован еще 80 лет назад. Для большинства фруктов применение пектиназы – практически непереносимое условие [14]. Пектиназа мацерирует клеточную ткань кожицы винограда и активизирует красящее вещество, что улучшает цвет готового продукта.

Также было установлено, что ферментных препаратов увеличивают выход сока. Наиболее эффективны в переработке плодово-ягодной обработки ягод черной смородины, черники и черноплодной рябины при температуре 45-55°C с использованием ферментов и в их сочетании с последующим подбраживанием на мезге. Ферментные препараты, позволяющие получать сверхнормативный выход сока (5-11%) из ягод черной смородины – *Фруктоцим колор, Sihazum МК, Sihazum P5* и *Рапидаза пресс*; из черной рябины – *Фруктоцим колор, Sihazum МК* [15].

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что для эффективного экстрагирования фенольных соединений, обеспечивающих нарядные темно-красные, рубиновые, малиновые цвета, насыщенный полный вкус с гармоничной терпкостью, с продолжительным послевкусием, необходим подбор оптимального баланса ферментов с разной субстратной специфичностью, которая может быть установлена в экспериментах с использованием различных смесей ферментов и различных сортов винограда.

Материалы и методы исследования.

В качестве ферментного препарата использовали *Пектинол F-RKM 0719*, полученный глубинным культивированием штамма *Aspergillus awamori F-RKM 0719*, а также разработанный мультиэнзимный комплекс состава *Пектинол F-RKM 0719, Рапидаза Пресс, Целловиридин Г20х, Тренолин Опти* в соотношении 90:5:3:2.

Объектами исследований служили также виноград красных сортов Каберне Совиньон и Каберне Фран, Саперави, Матраса, произрастающих в Туркестанской области.

В исследованиях использовался ряд общепринятых методик: определение ферментативной активности по методикам действующих ГОСТ Р: ГОСТ Р 55298-2012 – Методы определения пектолитической активности; ГОСТ Р 55293-2012 – Методы определения целлюлазной активности; ГОСТ Р 53973-2010 – Методы определения β-глюконазной активности; ГОСТ Р 55979-2014 – Методы определения пектат- и пектинлиазной активности; методы скрининга и

селекции с использованием монохроматического света и нитрозометилмочевины; определение культурально-морфологических и биохимических характеристик мутантного штамма;

Результаты исследования и их обсуждение

В работе использованы ранее выделенный и исследованный перспективный штамм *A. awamori*, продуцирующий широкий спектр ферментов, не обладающий патогенными свойствами для организмов теплокровных животных и человека.

Разработан также эффективный метод и выбраны условия многоступенчатой селекции и мутагенеза с использованием монохроматического света с длиной волны $\lambda=530$ нм и мощностью светового потока 2-4 Вт/м² и химического мутагена – нитрозометилмочевины, которые позволили получить новый мутантный штамм (*Aspergillus awamori F-RKM 0719*) – продуцент комплекса ферментного препарата с общей пектолитической активностью 1,65 ед/мл, которая превышает по общей пектолитической активности родительский дикий штамм *Aspergillus awamori* в 7,5 раз [16].

Штамм *Aspergillus awamori F-RKM 0719* депонирован в Республиканском государственном предприятии на праве хозяйственного ведения «Республиканская коллекция микроорганизмов» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан. Ферментная активность нового штамма составила: пектиназная – 1,65 ед/мл, полигалактуроназная – 0,97 ед/мл, пектинэстеразная – 0,52 ед/мл, пектинлиазная – 1,30 ед/мл, β-глюконазная – 1,22 ед/мл, целлюлолитическая – 0,90 ед/мл [17].

Пектинол F-RKM 0719 с высокой степенью очистки по цветности – 99%, с удельной активностью – 525,0 ед/мл белка, с высоким выходом ферментов по пектиназной – 385000 ед/г, полигалактуроназной – 270000 ед/г, пектинэстеразной – 121000 ед/г, целлюлазной – 134000 ед/г, β-глюконазной активности – 324000 ед/г [17].

Полученный ферментный препарат *Пектинол F-RKM 0719* по существу уже представляет собой мультиэнзимный комплекс.

Процесс производства микробных ферментных препаратов чрезвычайно сложен и состоит из многих технологических операций. Начальная стадия этого процесса, имеющая целью вырастить микроорганизмы-продуценты пектиназ, состоит из получения посевного материала, подготовки питательной среды и ее стерилизации, стерилизации воздуха, засева производственной

ПС, выращивание микроорганизма-продуцента фермента [18].

Литературный анализ подкрепленный экспериментальными опытами показал существенную проблему в различных методах очистки ферментных препаратов, которые были или сложными в выполнении или давали неожиданный результат.

Для выделения ферментов разработан комбинированный способ очистки и активации пектиназ, который основан на последовательном удалении из ферментных растворов отдельных групп неактивных примесей с помощью применения активированного угля и анионообменной смолы. Использование гидроксипатита позволяет достичь активации пектиназ за счет удаления низкомолекулярных белков.

Установлены также основные параметры при pH 4,0-5,0 и температуре 30-50°C, обеспечивающие стабильность ферментного препарата и сохранение уровня активности пектиназ в течение длительного времени. В результате получен высокоочищенный ферментный препарат *Пектинол F-RKM 0719*, общий выход ферментов по пектиназной активности которого составил 10,8 ед/мл.

Введение незначительного количества коммерческих препаратов *Ратидаз Пресс*, *Целловиридин Г20х* и *Тренолин Опти* в составе основного препарата *Пектинол F-RKM 0719* с одной стороны практически неощутима. С другой

стороны использование высокоэффективных ферментов с гемицеллюлазной, целлюлогидролазной, ксиланазной, целлюлобиазной, амилазной активностями не только способствует обогащению состава, но и вызвало повышение активности основных компонентов на 18-25%, что подтверждает возникновение синергетического эффекта.

Чтобы знать объекты воздействия новых ферментных препаратов, нами изучен качественный и количественный состав компонентов фенольного комплекса, включая содержание ресвератрола разных сортов винограда, с произрастающего в ЮКО, и с учетом созревания плода и накопления в нем сахаров, как одного из важного фактора зрелости винограда.

Одними из самых распространенных технических сортов винограда является Каберне Совиньон, Каберне Фран, Саперави и Матраса которые используются для приготовления красных столовых вин.

Результаты эксперимента, проведенные в период между началом изменения окраски виноградных ягод и сбором урожая приведены на рисунки 1-4.

Общее содержание фенольных соединений, антоцианов и ресвератрола в экстракте было определено с использованием спектрофотометра с построением стандартных кривых, анализы проводили в трех повторностях, расчет проводили с учетом погрешности + 0,05.

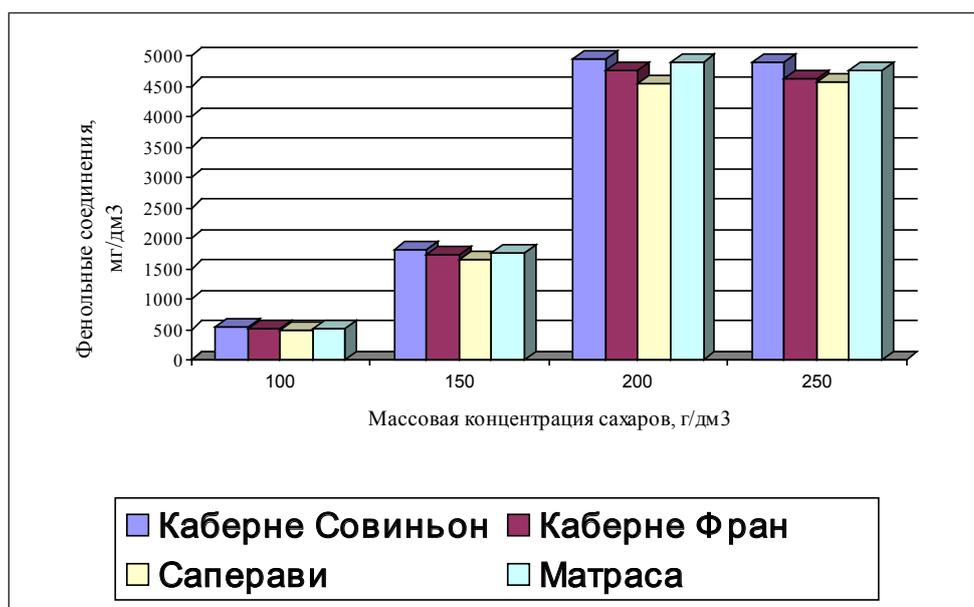


Рисунок 1 – Динамика изменения содержания фенольных соединений в красных сортах винограда

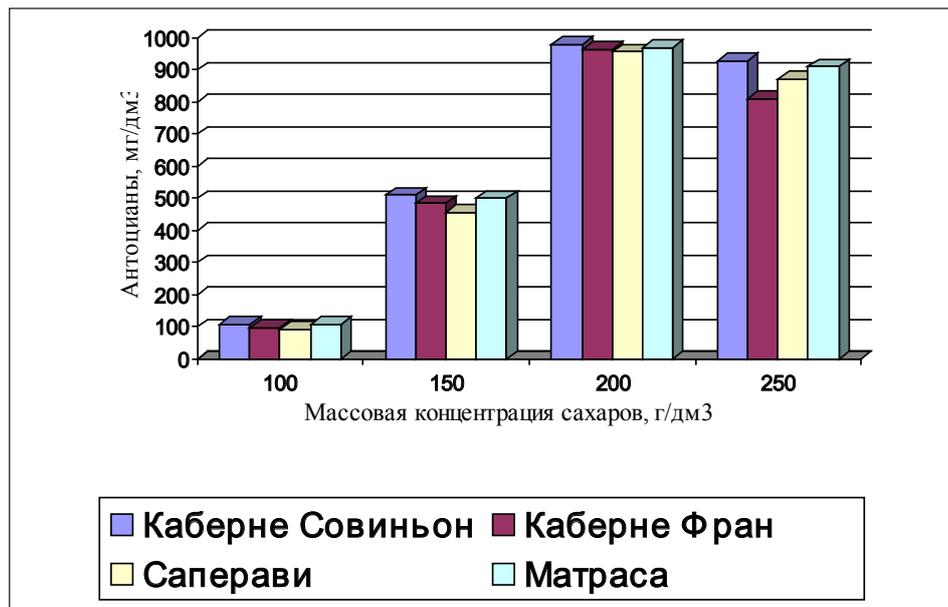


Рисунок 2 – Динамика изменения содержания фенольных антоцианов в красных сортах винограда

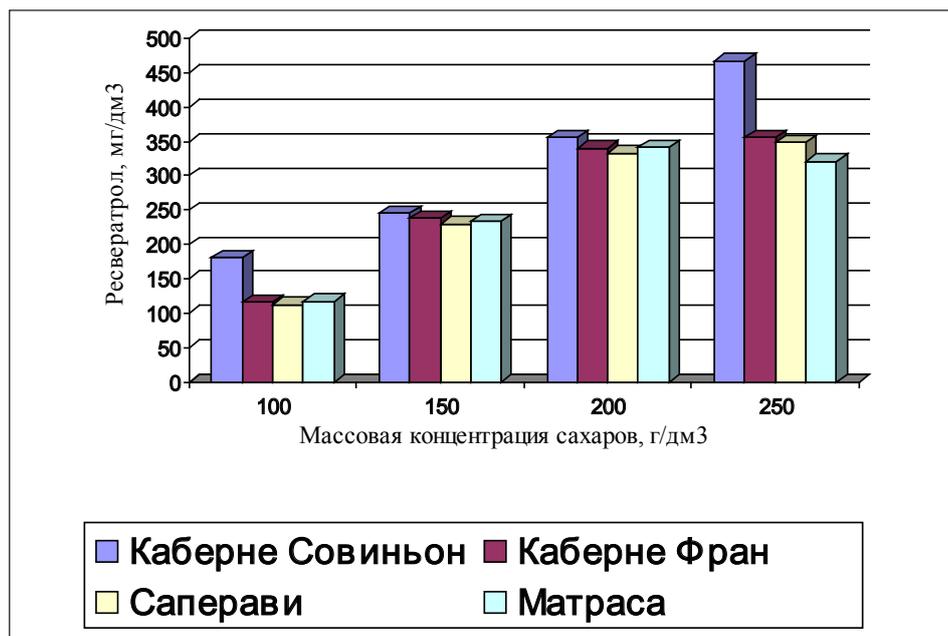


Рисунок 3 – Динамика изменения содержания ресвератрола в красных сортах винограда

Экспериментальные данные показали, что по мере созревания винограда до содержания сахаров в винограде 24-25 %, массовая концентрация фенольных соединений и красящих веществ увеличивается во всех сортах винограда, также растет и содержание ресвератрола, и максимальное значение достигается в сорте Каберне Совиньон 668 мг/

дм³. Концентрация антоцианов также повысилась во всех исследуемых сортах винограда, кислотность при этом во всех исследуемых сортах снижалась по мере созревания винограда почти в два раза от 11,2 до 6,4 г/дм³. Наибольшая концентрация фенольных соединений, антоцианов и ресвератрола в винограде сорта Каберне Совиньон.

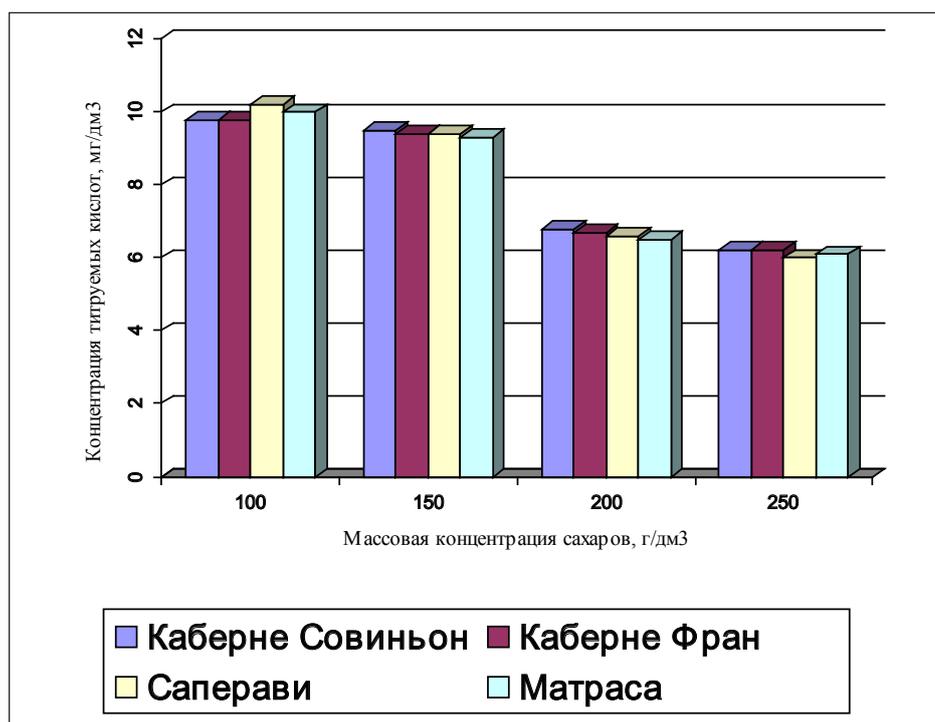


Рисунок 4 – Динамика изменения концентрации титруемых кислот в красных сортах винограда

Для выделения ресвератрола из виноградных выжимок, предварительно измельченную, проводили экстракцию с помощью водного раствора спирта 70 % спирта как один из оптимальных экстрагентов. Затем после упаривания добавляли горячую воду, и после удаления неполярных соединений каратиноидов, жиров и других липофильных веществ из водной среды агликонами извлекали ресвератрол. Опыты по извлечению проводили в трех комбинациях с использованием культуры *Aspergillus awamori* F-RKM 0719, ферментного препарата *Пектинол F-RKM 0719* и контрольный с использованием только химических реагентов.

Проведенные анализы полностью подтвердили эффективность использования ферментного препарата *Пектинол F-RKM 0719*. Во всех проведенных экспериментах наблюдается увеличение количества выделенного ресвератрола почти в два раза по сравнению с контрольными опытами. Также и использование штамма *Aspergillus awamori* F-RKM 0719, продуцента ферментного препарата *Пектинол F-RKM 0719* показал положительное воздействие на выход ресвератрола. При использовании сорта Каберне Совиньон выход ресвератрола максимальный, что соответствует предварительно проведенным опытам по извлечению ресвератрола из виноградных ягод различных сортов. Температура

проведения процесса экстракции оказывает существенное влияние на количество выделенного ресвератрола вследствие изменения структуры белкового комплекса мультиэнзимного компонента, а эффективности обмена отдельных компонентов своим содержанием и совокупности явлений, изменяющих микроокружение основного фермента – *Пектинол F-RKM 0719* другими препаратами.

Проведенные эксперименты по экстрагированию ресвератрола показали увеличение выделенного экстракта с повышением температуры от 20 до 35 °С, дальнейшее повышение температуры положительно сказалось только в контрольных опытах без использования штамма *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 и ферментного препарата *Пектинол F-RKM 0719*. Таким образом проведенные эксперименты показали эффективность использования штамма *Aspergillus awamori* F-RKM 0719, продуцента ферментного препарата *Пектинол F-RKM 0719* и мультиэнзимный комплекс ферментного препарата *Пектинол F-RKM 071*, при этом оптимальной температурой экстракции была выбрана температура 35 °С, с продолжительностью 30 минут.

Органолептические и физико-химические показатели полученного экстракта из кожуры красного винограда представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Влияние ферментного препарата Пектинол F-RKM 0719, продуцируемый штаммом *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 на извлечение ресвератрола

№	Сорта винограда	Виды опытов	Время проведения экстракции, мин					
			10	20	30	40	50	60
1	Каберне Совиньон	<i>Aspergillus awamori</i> F-RKM 0719,	123,09	397,03	466,32	489,76	494,12	497,66
		Пектинол F-RKM 0719	144,12	400,21	683,35	691,76	694,12	699,62
		Контрольный	123,09	245,43	347,03	389,76	390,12	392,66
2	Каберне Фран	<i>A. awamori</i> F-RKM 0719,	111,23	321,03	346,35	349,76	354,12	367,66
		Пектинол F-RKM 0719	134,12	369,21	513,35	531,76	537,12	639,62
		Контрольный	98,41	201,43	247,03	259,76	261,12	267,66
3	Саперави	<i>Aspergillus awamori</i> F-RKM 0719,	91,23	269,21	278,35	279,77	280,65	288,82
		Пектинол F-RKM 0719	102,12	339,24	446,41	451,54	457,48	459,51
		Контрольный	76,14	201,38	221,41	259,19	261,41	267,62
4	Маграса	<i>Aspergillus awamori</i> F-RKM 0719,	123,37	334,58	357,62	359,39	362,61	364,56
		Пектинол F-RKM 0719	137,41	373,83	545,18	551,29	558,03	659,93
		Контрольный	104,18	232,39	256,46	269,73	277,72	279,52

Арбуз сок в лечебном питании используется при малокровии, заболеваниях сердечно-сосудистой системы, болезнях печени, камнях желчного пузыря и мочевыводящих путей, а также как мочегонное при мочекишлом диурезе, при ожирении и необходимости

голодания по показанию в ходе лечения. Он не вызывает раздражения почек и мочевыводящих путей. Содержание в арбузной мякоти легкоусвояемых сахаров и воды обуславливает применение арбуза при хронических и острых заболеваниях печени [19].

Таблица 2 – Органолептические и физико-химические показатели полученного экстракта из кожуры красного винограда.

Наименование показателей	Характеристика и значение показателя
Внешний вид Цвет Запах Вкус	Непрозрачная жидкость Красный Приятный, фруктовый Приятный, без горечи
pH	4,2
Массовая доля СВ, %	18,0

Гранатовый сок обладает самой высокой антиоксидантной способностью по сравнению с другими богатыми полифенолом напитками, такими как красное вино, виноградный сок и зеленый чай. Благодаря мощным антиоксидантным свойствам гранатового сока очень полезен для здоровья. Два основных класса полифенолов привлекают интерес исследова-

телей: флавоноиды, в частности антоцианидины (дельфинидин, цианидин и пеларгонидин), которые присутствуют в кожуре или соке, и гидролизуемые танины, в том числе эллагитаннин, пуникагин, которые уникальны для граната [20, 21].

Получение напитков на основе соков плодово-ягодного сырья позволяет пополнить

ассортимент продуктов лечебно-профилактического назначения за счет обогащения конечного продукта рядом функциональных ингредиентов, и как следствие дает общее улучшение здоровья у населения [22, 23].

Для улучшения органолептических свойств и повышение питательной и биологической

ценности за счет дополнительного содержания антиоксиданта, который находится в коже красного винограда. Это достигается тем, что консервированный сок, содержащий арбузный сок, гранатовый сок вносится экстракт из кожуры красного винограда при следующем содержании компонентов (таблица 3, 4),

Таблица 3 – Содержание компонентов

Сырье	мас. %:
Арбузный сок	80,0-81,0;
Гранатовый сок	18,0-18,5;
Экстракт из кожуры красного винограда	2,00-2,5;

Таблица 4 – Влияние экстракта из кожуры красного винограда на органолептические показатели сока

Показатель	Доза экстракта из кожуры красного винограда, %			
	0-1,50	1,50-2,5	2,6-2,9	Более 3
Органолептические показатели: вкус и запах	Без ощутимых изменений	без постороннего привкуса и запаха	слабый специфический привкус	сильно выраженный специфический привкус
цвет	Красный			Бурый с красным оттенком

Качество сырья, полуфабрикатов и готового продукта определяют при помощи органолептических, физических и химических методов, установленных согласно техническим регламентам и нормативным. Необходимым условием, обеспечивающим рациональное ведение технологического процесса в производственных условиях, высокое качество выпускаемой продукции и соответствие ее требованиям стандартов, является хорошая организация теххимического и микробиологического контроля производства [24, 25].

Заключение

Проведенные эксперименты показали эффективность использования штамма *Aspergillus awamori* F-RKM 0719, продуцента ферментного препарата *Пектинол F-RKM 0719* и мультиэнзимный комплекс ферментного препарата *Пектинол F-RKM 071* для максимального извлечения ресвератрола из кожуры винограда при этом оптимальной температурой экстракции была выбрана температура 35 °С, с продолжительностью 30 минут.

Экспериментально доказано, что по мере созревания винограда концентрация ресвератрола увеличивается, и достигает в сорте Каберно Совиньен 467 мг/ дм³. Количество ресвератрола из виноградных выжимок сорта Каберно Совиньен также максимально, и возросло с 392,66 мг/ дм³ контрольный образец, при использовании штамма *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 – 497,66 мг/ дм³, а при извлечении ресвератрола ферментным препаратом Пектинол F-RKM 0719 экстрагировано 699,62 мг/ дм³.

Дальнейшее использование экстракта винограда в производстве комбинированного сока на основе арбузного и гранатового, позволит обогатить напиток ресвератролом, не снижая при этом органолептических качеств готового продукта.

Источник финансирования: работа была выполнена в рамках реализации проекта по теме АР05132810 “Научно-практические основы технологии микрокапсулирования биологически-активных веществ и принципиально новых стимуляторов развития растений с целью интенсификации производства сельскохозяйственной продукции” по договору №164-24 от 15.03.2018 г.

Литература

- 1 Мазнев Н. И. Арбуз съедобный // Энциклопедия лекарственных растений. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: Мартин, 2004. – 496 стр. – ISBN 5-8475-0213-3.
- 2 Бекетов А. Н. Виноградная лоза // Энциклопедический словарь Брокгауза и Ефрона : в 86 т. (82 т. и 4 доп.). – 2002. – С. 20–31. – 222 с.
- 3 Блиева, Р.К. Новый метод длительного культивирования и селекции продуцентов ферментов // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. раб. – Минск: Изд-во «Белорусская наука», 2013. – С. 29-39.
- 4 Pedrolli D.B., Monteiro A.C., Gomes E., Carmona E.C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes // *Open Biotechnology Journal*. – 2009. – Vol.3. – P. 9-18.
- 5 Донченко Л.В., Фирсов Г.Г. Пектин: основные свойства, производство и применение: монография. – Москва: ДеЛи принт, 2007. – 276 с.
- 6 Мурадов М.С., Даудова Т.Н., Рамазанова Л.А. Экстракция красящих веществ из растительного сырья // *Хранение и переработка сельхозсырья*. – 2000. №4. – С. 21-27.
- 7 Toaldo I.M., Gois J.S., Fogolari O., Hamann D., Borges D.L.G., Bordignon-Luiz M.T. Phytochemical polyphenol extraction and elemental composition of *Vitis labrusca* L. grape juices through optimization of pectinolytic activity // *Food and Bioprocess Technol.* – 2014. – V. 7. №9. – P. 2581-2594.
- 8 Sandri I.G., Fontana R.C., Barfknecht D.M., Silveira M.M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases // *Food Science and Technology*. – 2011. – V. 44. – P. 2217-2222.
- 9 Mieszczakowska-Fraç M., Markowski J., Zbrzeźniak M., Płocharski W. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices // *Food Science and Technology*. – 2012. – V. 49. – P. 251-256.
- 10 Мехузла Н.Н., Щербаков С.С. Использование новых ферментных препаратов гидролитического действия при производстве природно-полусладких вин // *Материалы III Международной научно-технической конференции, посвященной 80-летию ГОУВПО «Воронежская государственная технологическая академия»* – Воронеж: изд-во ВГТА, 2009. – С. 464-466.
- 11 Агеева Н.М., Маркосов В.А. Процианидины красных сортов винограда и красных столовых вин // *Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ*. – 2013. – Т. 4. – С. 195-202.
- 12 Ducasse M.A., Williams P., Canal-Llauberes R.M., Mazerolles G., Cheynier V., Doco Th. Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines // *J. Agr. Food Chem.* – 2011. – Vol. 59. № 12. – P. 6558-6567.
- 13 Гнетько Л.В., Белявцева Т.А., Агеева Н.М. Влияние ферментных препаратов на ароматический комплекс яблочных сброженно-спиртованных соков // *Научные труды Государственного научного учреждения Северо-Кавказского зонального научно-исследовательского института садоводства и виноградарства Российской академии сельскохозяйственных наук*. – 2013. – Т. 4. – С. 85-91.
- 14 Чернович Ф.Л. Влияние комплексов эндогенных ферментов на время контактирования виноградного сусла с мезгой // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 2007. – № 2. – С. 115-120.
- 15 Мартисян Е.А., Жуков Н.А. Оптимизация стадии ферментативной обработки плодово-ягодного сырья при получении спиртованных соков // *Всероссийская научно-техническая конференция «Наука – производство – технология – экология»*. – 2005. – Т. 2, Киров, 2005. – С. 194
- 16 Dzhakasheva M., Kedelbaev B., Peter Lieberzeit, Mutalievа B., Elemanova Zh., Esimova A., Abubakirova A. Selection and characteristic of the *Aspergillus awamori* mutant strain – pectinase producers // *ICITE – 2016: III international conference «Industrial technologies and engineering»*. – Shymkent, 2016. – P. 256-260
- 17 Мультиэнзимная композиция для виноделия: пат. на полезн. мод. РК: МПК С12N9/14 Джакашева М.А.; Кедельбаев Б.Ш.; Сапарбекова А.А.; Ашир А.К.; заявитель и патентообладатель ЮКГУ им. М. Ауэзова. – № 016/0147.2; заявл. 18.03.2016;
- 18 Pedrolli D.B., Monteiro A.C., Gomes E., Carmona E.C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes // *Open Biotechnology Journal*. – 2009. – Vol. 3. – P. 9-18.
- 19 Горышкина Т. К. Бахчевые культуры // Т. К. Горышкина, М. Е. Игнатъева. – Киев: Аграрная наука, 2000. – 149 с.
- 20 Борисова А. Г. Род 921. Гранат – *Rubica* // *Флора СССР*. В 30 т. – М., 1999. – Т. XV. – С. 553. – 742 с.
- 21 Шобингер У. (ред.). Фруктовые и овощные соки: научные основы и технологии / пер. с нем. под общ. науч. ред. А.Ю. Колеснова, Н.Ф. Берестяна и А.В. Орещенко. – СПб.: Профессия, – 2004. – 640 с.
- 22 Сарафанова Л.А. Применение пищевых добавок в индустрии напитков. – СПб.: Профессия, – 2007. – 240 с.
- 23 Панкова Н.В. (ред.) Инновационные технологии в области пищевых продуктов и продукции общественного питания функционального и специализированного назначения. Коллективная монография. – СПб.: Изд-во «ЛЕМА», – 2012. – 314 с.
- 24 Олефирова, А.П. Органолептическая оценка пищевых продуктов: учебно-практич. Пособие. – Улан-Уде: Изд-во ВСГТУ, – 2010. – 192с.
- 25 Горбунова, В.П. Порядок и сроки приемки товаров по количеству и качеству. – М.: Экспертное бюро, 2008. – 98 с.

References

- 1 Ageeva N.M., Markosov V.A. (2013) Procyanidin krasnyh sortov vinograda e krasnyh stolovyh vin [Procyanidins of red grape varieties and red table wines] *Scientific works of the GNU SKZNIISiV*. vol 4, pp. 195-202.

- 2 Azad, A.K. M., Ali, M. A., Akter, M.S., Rahman, M.J., Maruf Ahmed, M. (2014). Isolation and Characterization of Pectin Extracted from Lemon Pomace during Ripening. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. Vol. 2, No. 2, pp. 30-35.
- 3 Beketov A.N. (2002) Vinogradnaya loza [Grapevine]. *Encyclopedic Dictionary of Brockhaus and Efron*: vol. 86, pp. 20-31.
- 4 Blieva R.K. (2013) Novye metod dlitel'nogo kultivirovaniya e selekcii producentov fermentov [A new method of long-term cultivation and breeding of enzyme producers] *Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: Coll. scientific works*. Minsk. Publishing House "Belarusian Science". pp. 29-39/
- 5 Borisova A.G. (1999) Rod 921. Granat-- Punica [Granat – Punica] *Flora of USSR* vol. 30 , pp 553 – 742 .
- 6 Chernovich F.L. (2007) Vliyaniye kompleksov endogennykh fermentov ns vremi kontaktirovaniya vinogradnogo susla s mezhgoy [Influence of complexes of endogenous enzymes on the time of contact of grape must with pulp] *Application.biochemical and microbiol.* vol. 2, pp. 115-120.
- 7 Dzhakhasheva, M., Kedelbaev, B., Peter Lieberzeit, Mutaliev, B., Elemanova, Zh., Esimova, A., Abubakirova, A. (2016) *Aspergillus awamori* mutant strain pectinase producers, III international conference Industrial technologies and engineering. Shymkent, pp. 256-260.
- 8 Donchenko L.V., Firsov G.G. (2007) Pektin: osnovnye svoystva, proizvodstvo e primenenie [Pectin: basic properties, production and use] monograph. -Moscow: DeLi Print, pp. 276.
- 9 Ducasse M.A., Williams P., Canal-Llauberes R.M., Mazerolles G., Cheynier V., Doco Th.
- 10 (2011) Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines // *J. Agr. Food Chem.* vol. 59, no 12, pp. 6558-6567.
- 11 Gnetko L.V., Belyavtseva T.A., Ageeva N.M. (2013) Vlianiye fermentnykh preparatov na aromatische kompleks sbrosheno spirtovykh sokov [The influence of enzyme preparations on the aromatic complex of apple fermented-alcoholized juices] *Scientific works of the State Scientific Institution of the North Caucasus Zonal Scientific Research Institute of Horticulture and Viticulture of the Russian Academy of Agricultural Sciences.* vol. 4, pp. 85-91.
- 12 Gobunova, V.P. (2008) Poraydok e sroki priemki tovarov po kolichestvu e kachestvu [The requirement and time of the good traces in quality and quantity]. *The EXPERT BUREAU*, pp. 98.
- 13 Goryshkina, T. K. (2009) Bahchevye kultury [Watermelon culture] *Kiev. Agrarian science*, pp. 149.
- 14 Kedelbayev B., Saparbekov A.A . Ashir A.K. Dzhakhasheva M.A. (2016) Multienzyme composition for winemaking: Pat. on useful Maud. RK: IPC C12N9 / 14 MA. applicant and patent holder M. Auezov SKSU no 016 / 0147.
- 15 Martisyan E.A., Zhukov N.A. (2005) Optimizatsiya stadiya fermentnoy obrabotki plodovo yagodnogo Syria pri poluchenii spirtovykh sokov [Optimization of the stage of enzymatic processing of fruit and berry raw materials in the production of alcoholized juices] *All-Russian Scientific and Technical Conference "Science – production – technology – Maznev N.I. (2004) Arbut syedobnyi [Edible watermelon]. Encyclopedia of medicinal plants. 3rd ed., Corr. and add. Martin, 496 pp.*
- 16 Mekhuzla N.N., Shcherbakov S.S. (2009) Ispolzovanie novykh fermentnykh preparatov gidroliticheskogo deystviya pri proizvodstve prirodno polusladkiykh vin. [The use of new enzymatic preparations of hydrolytic action in the production of naturally semi-sweet wines] *Proceedings of the III International Scientific and Technical Conference dedicated to the 80th anniversary of the Voronezh State Technological Academy, Voronezh: VGTA publishing house.* pp. 464-466.
- 17 Mieszczakowska-Fraş M., Markowski J., Zbrzeźniak M., Plocharski W. (2012) Impact of the quality of the blackcurrant and plum juices. *Food Science and Technology.* vol. 49. pp. 251-256.
- 18 Muradov MS, Daudova T.N., Ramazanova L.A. (2000) Ekstraktsiya krasashih veshchestv iz rastitelnogo syrya [Extraction of coloring matter from vegetable raw materials] *Storage and processing of agricultural raw materials.* vol. 4, pp.21-27.
- 19 Pankova N.V. (ed.) (2012) Inovatsionnye tehnologii v oblasti pishnykh produktov e produkcii obshchestvennogo pitaniya funktsionalnogo e spetsializirovannogo naznacheniya [Innovative technologies in the field of foodstuffs and products of general nutrition of functional and specialty equipment]. *Collective monograph. St. Petersburg: Publishing House "LEMA",* pp. 314.
- 20 Oleframes A.P. (2010) Organolepticheskaya ocenka pishnykh produktov [Organizational estimate of food products]: practical book. Ulan-Ude, pp.192.
- 21 Pedrolli D.B., Monteiro A.C., Gomes E., Carmona E.C. (2009) Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes // *Open Biotechnology Journal.* vol.3, pp 9-18.
- 22 Sandri I.G., Fontana R.C., Barfknecht D.M., Silveira M.M. (2011) Clarification of fruit juices by fungal pectinases // *Food Science and Technology.* vol. 44, pp. 2217-2222.
- 23 Sarafanova L.A. (2007) Primeneniye pishnykh dobavok v industrii napitkov [The use of food additives in the beverage industry] SPb, Profession, pp. 240.
- 24 Schobinger U. (ed.) (2004) Fruktovye i ovoshnye soki [Fruit and vegetable juices] *scientific foundations and technologies / transl. from German by total scientific ed. A.Yu. Kolesnova, N.F. Berestnyaya and A.V. Oreschenko. SPb . Profession,* pp. 640.
- 25 Toaldo, I.M., Gois, J.S., Fogolari, O., Hamann, D., Borges, D.L.G., Bordignon-Luiz, M.T. (2014) Phytochemical polyphenol extraction and elemental composition of the *Vitis labrusca* L. grape juices through pectinolytic activity // *Food and Bioprocess Technol.* vol. 7, no 9. pp. 2581-2594.

Текебаева Ж.Б.¹, Абжалелов А.Б.²

¹Казахский университет технологии и бизнеса, Казахстан, г. Астана,
e-mail: bio_kazutb@mail.ru

²Республиканская коллекция микроорганизмов, Казахстан, г. Астана

АККУМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA VULGARIS* И 2 И *PARACHLORELLA KESSLERI* У 1 ПО ОТНОШЕНИЮ К ПОЛЛЮТАНТАМ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Степень загрязненности водоемов Северного Казахстана из года в год неуклонно растет вследствие роста техногенной нагрузки на водные источники. В связи с этим исследования по решению проблем очистки открытых водоемов от различных загрязнителей входят в число важных мероприятий по улучшению экологической обстановки региона.

В результате альголизации загрязненных природных вод штаммами зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* И 2 и *Parachlorella kessleri* У 1 в течение 14 суток отмечено улучшение показателей качества воды: увеличивается количество растворенного кислорода, снижаются показатели по БПК₅ во всех пробах, уменьшаются концентрации сульфатов, нитритов, нитратов, солей аммония, магния, хлоридов, меди, железа, цинка и марганца. Эффективность очистки в целом у обоих штаммов по нитритам составила до 62,5%, по аммонийно-солевому – до 65,7%, по меди – до 60,7%, железу – 51,9%, цинку – до 40%, нитратам – до 40,5%, марганцу – до 36,4%, сульфатам – 25,6%, магнию – до 18,8% и хлоридам – до 5,6%.

Благодаря аккумулялирующей способности штаммов *Chlorella vulgaris* И 2 и *Parachlorella kessleri* У 1 появляется возможность проводить процесс эффективной биоочистки загрязненных природных, а также сточных вод от загрязнителей различного происхождения.

Ключевые слова: загрязнители, микроводоросли, аккумулялирующие свойства, тяжелые металлы, водоем, альголизация.

Tekebaeva Zh.B.¹, Abzhalelov A.B.²

¹Kazakh University of Technology and Business, Kazakhstan, Astana,
e-mail: bio_kazutb@mail.ru

²Republican collection of microorganisms, Kazakhstan, Astana

The accumulating properties of the microalgae *Chlorella vulgaris* И2 and *Parachlorella kessleri* У 1 in relation to pollutants of different origin

The degree of pollution of the reservoirs of Northern Kazakhstan from year to year is growing steadily, due to the growth of the technogenic load on water sources. In this regard, studies to solve the problems of clearing open reservoirs from various pollutants are among the important measures to improve the ecological situation in the region.

As a result of algalization of contaminated natural waters with strains of green microalgae *Chlorella vulgaris* И 2 and *Parachlorella kessleri* У 1, water quality indicators have been improving for 14 days: the amount of dissolved oxygen increases, the BOD₅ values in all samples decrease, the concentrations of sulfates, nitrites, nitrates, salts decrease ammonium, magnesium, chloride, copper, iron, zinc and manganese. The overall purification efficiency in both strains for nitrite was up to 62,5%, for ammonium salt – up to 65,7%, for copper – up to 60,7%, for iron – 51,9%, for zinc – up to 40%, for nitrates – up to 40,5%, manganese – up to 36,4%, sulfates – 25,6%, magnesium – up to 18,8% and chlorides – up to 5,6%.

Due to the accumulating capacity of the strains *Chlorella vulgaris* И 2 and *Parachlorella kessleri* У 1 it is possible to carry out the process of effective bio-purification of contaminated natural as well as wastewater from pollutants of various origin.

Key words: pollutants, microalgae, accumulating properties, heavy metals, water reservoir, algalization.

Текебаева Ж.Б.¹, Әбжелелов А.Б.²

¹Қазақстандық технологиялар және бизнес университеті, Қазақстан, Астана қ.,
e-mail: bio_kazutb@mail.ru

²Республикалық микроорганизмдер жиынтығы, Қазақстан, Астана қ.

Микробалдырдың *Chlorella vulgaris* И 2 және *Parachlorella kessleri* У 1 жинақтағыш қасиеттері әртүрлі ластаушы заттарға қатысты

Солтүстік Қазақстан су қоймаларының ластану дәрежесі жыл сайын су көздеріне техногендік жүктеменің өсуіне байланысты тұрақты түрде артып келеді. Осыған байланысты әртүрлі ластағыштардан ашық су қоймаларын тазарту мәселелерін шешу аймақтағы экологиялық жағдайды жақсартудың маңызды шаралары болып табылады. Ластанған табиғи сулардың жасыл микробалдырлары *Chlorella vulgaris* И 2 және *Parachlorella kessleri* У 1 штамдары бар судың сапа көрсеткіштері 14 күнде жақсарып келеді: ерітілген оттегіні көбейтеді, барлық үлгілердегі БОС₅ шамасы, сульфаттар, нитраттар, нитриттер, тұздардың концентрациясы, аммоний, магний, хлорид, мыс, темір, мырыш және марганец төмендейді. Нитрит үшін екі штамның тазарту тиімділігі – 62,5%, аммоний тұздары үшін – 65,7%, мыс үшін – 60,7%, темір үшін – 51,9%-ға, мырыш үшін – 40%, нитраттарға – 40,5%, марганец – 36,4%, сульфаттар – 25,6%, магний – 18,8% және хлоридтер – 5,6% дейін. *Chlorella vulgaris* И 2 және *Parachlorella kessleri* У 1 штамдарының жинақтаушы қуаттылығына байланысты әртүрлі ластаушы заттардан ластанған табиғи және биологиялық тазарту процесін жүзеге асыруға болады.

Түйін сөздер: ластаушы заттар, микробалдырлар, жинақтаушы қасиеттері, ауыр металдар, су қоймасы, альголизация.

Введение

В Казахстане исследования в области микро-альгоэкологии активно проводились в 90-е годы. Возрастающая урбанизация и, вследствие этого, загрязнение естественных и искусственных водоемов требуют разработки и внедрения для оценки их состояния и ремедиации новых экобиотехнологий, среди которых важнейшее место занимают технологии, основанные на использовании водных микроорганизмов [1].

В работах последнего десятилетия внимание исследователей привлекают фототрофные организмы — микроводоросли, цианобактерии и высшие водные растения, многие из которых способны использовать в качестве источников питания минеральные вещества и простые органические соединения, имеющиеся в стоках, активно поглощая ионы азота, фосфора и другие биогенные элементы. Отмечается, что некоторые из них обладают высокой кумулятивной способностью по отношению к тяжелым металлам и радиоактивным элементам [2-4].

В ряде исследований показана высокая кумулятивная способность микроводорослей в отношении тяжелых металлов и радиоактивных элементов [5-9], деструктивная активность в отношении органических соединений [10-13],

заметная бактерицидная активность [14-17]. Все это ориентирует на использование микроводорослей для очистки загрязненных водных экосистем.

В настоящее время в биотехнологии развиваются исследования, направленные на использование микроорганизмов в качестве инструментов для удаления или концентрирования тяжелых металлов из загрязненных природных водоемов. В основе такой технологии лежит способность клеток некоторых микроорганизмов аккумулялировать тяжелые металлы в больших количествах из водной среды, а также из почвы и ила [18].

По статистическим данным, степень загрязненности вод рек и водоемов Северного Казахстана из года в год неуклонно растет, причиной которого является рост техногенной нагрузки на водные источники [19].

В связи с этим, исследования по решению проблем очистки открытых водоемов от различных поллютантов входят в число важных мероприятий по улучшению экологической обстановки региона, который был выбран не случайно. Несомненно, что объекты наших исследований находятся под воздействием антропогенной нагрузки, т.к. протекают на территории городов Астана и Павлодар, а также других городов и населенных пунктов.

Целью исследования являлось изучение аккумулярующих свойств микроводорослей по отношению к поллютантам различного происхождения, а именно некоторым тяжелым металлам, главным ионам и биогенным элементам, а также определение эффективности применения и перспективности использования микроводорослей в очистке загрязненных водоемов данными поллютантами.

Материалы и методы исследования

Материалами для исследований послужили образцы проб воды (15 проб), отобранные из водоемов г. Павлодар и Астана (рек Есиль, Акбулак, Иртыш, Усолка и канала Нура-Есиль), а также штаммы зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* И 2 (выделен из реки Иртыш) и *Parachlorella kessleri* У 1 (выделен из реки Усолка), отобранных в результате скрининга по накоплению биомассы и устойчивости к тяжелым металлам. Выделение и получение бактериологически чистых культуры микроводорослей проводили используя метод Максимовой и Пименовой с добавлением в питательную среду антибиотиков (пенициллина и нистатина), а также метод предельных разведений по Больду [20]. Отбор проб воды проводили в июне – августе 2015-2017гг. (в период активной вегетации микроводорослей) согласно общепринятым в гидробиологии методам [20, 21].

При проведении химического анализа на содержание тяжелых металлов пробы воды сразу после отбора были фиксированы азотной кислотой (на 500 мл воды 0,5 мл азотной кислоты). Пробоподготовку и измерения проводили по методике Лурье [22] на атомно-абсорбционном спектрометре с использованием пламенной атомизации АAnalyst 400 (Perkin Elmer, США). Главные ионы и биогенные элементы определяли согласно общепринятым химическим методам [23-25].

Содержание тяжелых металлов, главных ионов и биогенных элементов определяли в исходных образцах воды (до закладки модельного эксперимента) и в пробах воды после альголизации (по окончании культивирования штаммов микроводорослей). Культивирование проводили на природной воде исследуемых источников в лабораторных условиях при комнатной температуре 26-28°C в колбах объемом 250 мл (по 100 мл воды) в течение 14 суток, одновременно производили подсчет числа клеток микроводорослей с помощью камеры Горяева [20] на 1-е,

3-и, 5-е, 7-е, 10-е и 14-е сутки культивирования с использованием микроскопа серии Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного окулярным микрометром и выводом изображения на монитор. Исходная плотность клеток микроводорослей составила $0,113 \cdot 10^6$ - $0,167 \cdot 10^6$ кл/мл. Эксперимент по альголизации проб воды проводили в 3-х повторностях.

Эффективность очистки h_n сточных вод от n -го загрязняющего вещества определяется по формуле: $h_n = (c_{исх} - c_{кон}) / c_{исх} * 100\%$, где $c_{исх}$ – концентрация n -го загрязнителя на входе в очистное устройство, мг/л; $c_{кон}$ – концентрация n -го загрязнителя на выходе из устройства, мг/л [26].

Результаты исследования и их обсуждение

Поскольку процесс поступления металлов в окружающую среду является неизбежным по мере интенсификации промышленности и сельского хозяйства, следует признать актуальным вопрос прогнозирования развития водных биоценозов в условиях загрязнения водной среды. В этой связи возникает необходимость исследований устойчивости широкого круга микроводорослей к различным химическим элементам.

Металлы, как главные природные ресурсы, образуют группу опасных загрязнителей среды, и, в то же время, они являются необходимой частью ферментативных систем живых организмов [27].

Краткая характеристика исследуемых водоемов:

Река Иртыш (Ертыс) – река в Павлодаре, самая длинная река-приток в мире, протяженность – 4248 км. Протекает по территории Китая, Казахстана и России. Площадь бассейна — 1643 тыс. км². Иртыш вытекает из озера Зайсан на северо-запад через Бухтарминскую ГЭС, город Серебрянск и следом за ней расположенную Усть-Каменогорскую ГЭС. Ниже по течению находятся Шульбинская ГЭС и город Семей.

Река Усолка – река в Павлодаре, является правобережной старицей реки Иртыш и имеет длину 24,7 км. Русло реки Усолка в настоящее время сильно заилено, местами поросло деревьями и кустарниками, либо камышом. Воды реки используются многими садоводческими кооперативами для полива выращиваемых культур.

Река Есиль (Ишим) – река в Астане, левый и самый длинный приток Иртыша, протекает по территории Казахстана и России. Длина 2450 км, в том числе 1717 км протекает в пределах Ак-

молинской и Северо-Казахстанской областей, площадь бассейна 177 тыс. км². На реке Есиль расположены Вячеславское и Сергеевское водохранилища. Воды Есиля используются для водоснабжения и орошения, т.к. на реке и ее притоках расположены города и населенные пункты. Река имеет транспортное значение. Кроме того, река Ишим является рыбохозяйственным водоемом первой категории.

Река Акбулак (ручей Соленая балка) – мелкий правый приток Ишима, протекающий по юго-восточной части города Астана. Исток ручья находится в районе ТЭЦ-2.

Канал Нура-Есиль (г. Астана) – 25-километровый канал был построен для подачи воды из

реки Нура в г. Астану. Канал рассчитан на подачу 255 млн м³/год, в том числе: 78 млн. м³/год на нужды города, 11 млн. м³/год на полив, 120 млн. м³/год на санитарные попуски, 46,6 млн. м³/год потери на фильтрацию и испарение. На данный момент реконструировано свыше 10 километров.

Изначально был проведен химический анализ исходного содержания различных загрязнителей в отобранных пробах воды исследованных нами водоемов. Результаты представлены в таблице 1. Основными критериями качества воды являются значения ПДК (предельно-допустимых концентраций) загрязняющих веществ для рыбохозяйственных водоемов [28].

Таблица 1 – Исходное содержание различных загрязнителей в образцах природной воды исследуемых водоемов

№	Наименование	Значения ПДК, мг/л	Проба				
			Иртыш	Усолка	Есиль	Акбулак	Нура-Есиль
1	БПК ₅	3 мг/л ³	2,4	3,0	3,6	3,9	3,2
2	Растворенный кислород	не менее 4	10,2	11,1	9,7	8,9	8,3
3	Сульфаты	100	115	169	259	305	220
4	Хлориды	300	267	305	241	412	510
5	Магний	40	30	18	32	52,3	81,4
6	Нитриты	0,08	0,06	0,08	0,1	0,18	0,14
7	Нитраты	40	37	62	58	50	45
8	Аммоний солевой	0,5	0,7	0,55	0,85	1,25	1,4
9	Медь	0,001	0,0026	0,0028	0,0024	0,0058	0,0035
10	Кадмий	0,005	0,0037	0,0019	0,0032	0,0040	0,0025
11	Кобальт	0,005	0,0027	0,0015	0,0042	0,0033	0,0038
12	Никель	0,01	0,0028	0,0065	0,001	0,0048	0,0084
13	Марганец	0,01	0,007	0,008	0,041	0,022	0,035
14	Цинк	0,01	0,015	0,008	0,018	0,022	0,015
15	Свинец	0,01	0,0050	0,0029	0,0076	0,014	0,0074
16	Железо	0,1	0,500	0,382	0,940	0,561	0,678

В результате установлено, что в исходных образцах воды превышение предельно-допустимых концентраций было следующее: из групп тяжелых металлов – медь (от 2,4 до 5,8 ПДК), марганец (от 2,2 до 4,1 ПДК), цинк (от 1,5 до 2,2 ПДК) и железо (от 3,8 до 9,4 ПДК), главных ионов – сульфаты (от 1,2 до 3 ПДК), магний (от 1,3 до 2 ПДК), хлориды (от 1,4 до 1,7 ПДК), биогенных элементов – аммоний солевой (от 1,1 до 2,8 ПДК), нитриты (от 1,2 до 2,2 ПДК), нитраты (от 1,1 до 1,6 ПДК). Выявлено, что наибольшему

загрязнению подвержены реки Акбулак, Есиль и канал Нура-Есиль.

Полученные данные показывают, что по содержанию тяжелых металлов в природных водах наблюдается следующая зависимость: Fe > Cu > Mn > Zn (по убыванию). По веществам из группы главных ионов: сульфаты > магний > хлориды, биогенных элементов: соли аммония > нитриты > нитраты. Такое распределение концентраций в природных водах зависит как от абиотических, так и от антропогенных факторов.

Далее была проведена альголизация (внесение биомассы наиболее активных штаммов зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* И 2 и *Parachlorella kessleri* У 1, выделенных из исследованных водоемов) с целью определения их аккумулярующих свойств по отношению к некоторым тяжелым металлам, биогенным элементам и главным ионам. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, альголизация природной воды биомассой обоих штаммов микроводорослей в течение 14 суток привела к уве-

личению количества растворенного кислорода, снижению показателей по БПК₅ во всех пробах. Содержание растворенного кислорода и БПК₅ в воде характеризует кислородный режим водоема и имеет важнейшее значение для оценки его экологического и санитарного состояния. Кислород должен содержаться в воде в достаточном количестве, обеспечивая условия для дыхания гидробионтов. Он также необходим для самоочищения водоемов, т.к. участвует в процессах окисления органических и других примесей, разложения отмерших организмов [29].

Таблица 2 – Химический анализ проб воды исследуемых водоемов на содержание различных поллютантов после альголизации штаммами микроводорослей на 14-е сутки культивирования

Наименование	Значения ПДК, мг/л	Наименование пробы				
		Иртыш	Усолка	Есиль	Акбулак	Нура-Есиль
<i>Chlorella vulgaris</i> И 2						
БПК ₅	3 мг/л ³	2,1±0,12	2,6±0,04	3,3±0,12	3,8±0,04	3,0±0,13
Растворенный кислород	не менее 4	10,8±0,24	11,3±0,24	10,5±0,94	9,1±0,4	8,1±0,4
Сульфаты	100	93±3,6	132±2,04	204±1,63	227±1,63	185±2,44
Хлориды	300	255±3,26	298±1,22	239±1,63	389±1,63	501±2,44
Магний	40	25±0,001	15±0,41	26±1,63	43±2,04	67,5±2,04
Нитриты	0,08	0,03±0,01	0,03±0,004	0,07±0,008	0,09±0,008	0,05±0,008
Нитраты	40	22±1,22	39±2,44	42±0,001	33±1,63	29±2,04
Аммоний солевой	0,5	0,32±0,008	0,24±0,004	0,4±0,012	0,65±0,03	0,48±0,02
Медь	0,001	0,0018±4,08	0,0011±2,04	0,0016±8,16	0,0032±4,08	0,0025±0,0001
Цинк	0,01	0,012±0,002	0,0070±0,0008	0,015±0,002	0,018±0,0004	0,013±0,0008
Железо общее	0,1	0,383±0,006	0,236±0,001	0,625±0,002	0,344±0,001	0,478±0,0008
Марганец	0,01	0,007±0,0004	0,0077±8,16	0,036±0,0004	0,017±0,001	0,028±0,002
<i>Parachlorella kessleri</i> У 1						
БПК ₅	3 мг/л ³	2,2±0,08	2,8±0,04	3,4±0,02	3,8±0,02	2,9±0,08
Растворенный кислород	не менее 4	10,5±0,2	11,5±0,16	10,2±0,24	9,6±0,08	9,0±0,16
Сульфаты	100	104±2,04	135±1,64	217±2,04	249±4,89	201±2,45
Хлориды	300	260±2,86	303±1,22	238±0,82	405±2,45	509±2,04
Магний	40	27±0,41	17,4±0,45	29±3,67	48±1,63	71,4±0,08
Нитриты	0,08	0,03±0,004	0,04±0,001	0,06±0,004	0,07±0	0,07±0,02
Нитраты	40	26±1,64	44±0,82	38±5,3	31±3,26	31±1,64
Аммоний солевой	0,5	0,44±0,008	0,31±0,02	0,36±0,008	0,82±0,06	0,96±0,03
Медь	0,001	0,0017±8,16	0,0016±8,16	0,0016±0,0001	0,0044±0,0002	0,0025±0,0002
Цинк	0,01	0,009±0,0004	0,0056±0,0002	0,011±0,001	0,014±0,0008	0,010±0,001
Железо общее	0,1	0,368±0,002	0,185±0,0008	0,628±0,003	0,296±0,004	0,357±0,001
Марганец	0,01	0,0059±4,08	0,0064±0,0002	0,028±0,001	0,014±0,0004	0,023±0,01
Примечание: БПК ₅ – биологическое потребление кислорода за 5 суток						

После культивирования в образцах воды штамма *Chlorella vulgaris* И 2 отмечено снижение концентрации по следующим показателям: сульфаты (в Иртыше – от 115 до 93 мг/л, в Усолке – от 169 до 132 мг/л, в Есиле – от 259 до 204 мг/л, в Акбулаке – от 305 до 227 мг/л и Нуре-Есиль – от 220 до 185 мг/л), нитраты (в Иртыше – от 37 до 22 мг/л, в Усолке – от 62 до 39 мг/л, в Есиле – от 58 до 42 мг/л, в Акбулаке – от 50 до 33 мг/л и Нуре-Есиль – от 45 до 29 мг/л), нитриты (в Иртыше – от 0,06 до 0,03 мг/л, в Усолке – от 0,08 до 0,03 мг/л, в Есиле – от 0,1 до 0,07 мг/л, в Акбулаке – от 0,18 до 0,09 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,14 до 0,05 мг/л), соли аммония (в Иртыше – от 0,7 до 0,32 мг/л, в Усолке – от 0,55 до 0,24 мг/л, в Есиле – от 0,85 до 0,4 мг/л, в Акбулаке – от 1,25 до 0,65 мг/л и Нуре-Есиль – от 1,4 до 0,48 мг/л) и незначительно – по хлоридам (в Иртыше – от 267 до 255 мг/л, в Усолке – от 305 до 298 мг/л, в Есиле – от 241 до 239 мг/л, в Акбулаке – от 412 до 389 мг/л и Нуре-Есиль – от 510 до 501 мг/л), магнию (в Иртыше – от 30 до 25 мг/л, в Усолке – от 18 до 15 мг/л, в Есиле – от 32 до 26 мг/л, в Акбулаке – от 52,3 до 43 мг/л и Нуре-Есиль – от 81,4 до 67,5 мг/л).

Также выявлено снижение концентрации таких тяжелых металлов как: медь (в Иртыше – от 0,0026 до 0,0018 мг/л, в Усолке – от 0,0028 до 0,0011 мг/л, в Есиле – от 0,0024 до 0,0016 мг/л, в Акбулаке – от 0,0058 до 0,0032 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,0035 до 0,0025 мг/л), цинк (в Иртыше – от 0,015 до 0,012 мг/л, в Усолке – от 0,008 до 0,007 мг/л, в Есиле – от 0,018 до 0,015 мг/л, в Акбулаке – от 0,022 до 0,018 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,015 до 0,013 мг/л), железо (в Иртыше – от 0,500 до 0,383 мг/л, в Усолке – от 0,382 до 0,236 мг/л, в Есиле – от 0,940 до 0,625 мг/л, в Акбулаке – от 0,561 до 0,344 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,678 до 0,478 мг/л) и марганец (в Усолке – от 0,008 до 0,0077 мг/л, в Есиле – от 0,041 до 0,036 мг/л, в Акбулаке – от 0,022 до 0,017 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,035 до 0,028 мг/л).

После культивирования в образцах воды штамма *Parachlorella kessleri* У 1 происходило снижение концентрации поллютантов по следующим показателям: сульфаты (в Иртыше – от 115 до 104 мг/л, в Усолке – от 169 до 135 мг/л, в Есиле – от 259 до 217 мг/л, в Акбулаке – от 305 до 249 мг/л и Нуре-Есиль – от 220 до 201 мг/л), нитраты (в Иртыше – от 37 до 26 мг/л, в Усолке – от 62 до 44 мг/л, в Есиле – от 58 до 38 мг/л, в Акбулаке – от 50 до 31 мг/л и Нуре-Есиль – от 45 до 31 мг/л), нитриты (в Иртыше – от 0,06 до 0,03 мг/л, в Усолке – от 0,08 до 0,04 мг/л, в Есиле – от 0,1 до 0,06 мг/л, в Акбулаке – от 0,18 до

0,07 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,14 до 0,07 мг/л), солей аммония (в Иртыше – от 0,7 до 0,44 мг/л, в Усолке – от 0,55 до 0,31 мг/л, в Есиле – от 0,85 до 0,36 мг/л, в Акбулаке – от 1,25 до 0,82 мг/л и Нуре-Есиль – от 1,4 до 0,96 мг/л) и незначительно – по хлоридам (в Иртыше – от 267 до 260 мг/л, в Усолке – от 305 до 303 мг/л, в Есиле – от 241 до 238 мг/л, в Акбулаке – от 412 до 405 мг/л и Нуре-Есиль – от 510 до 509 мг/л), магнию (в Иртыше – от 30 до 27 мг/л, в Усолке – от 18 до 17,4 мг/л, в Есиле – от 32 до 29 мг/л, в Акбулаке – от 52,3 до 48 мг/л и Нуре-Есиль – от 81,4 до 71,4 мг/л).

Также выявлено снижение концентрации таких тяжелых металлов как: медь (в Иртыше – от 0,0026 до 0,0017 мг/л, в Усолке – от 0,0028 до 0,0016 мг/л, в Есиле – от 0,0024 до 0,0016 мг/л, в Акбулаке – от 0,0058 до 0,0044 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,0035 до 0,0025 мг/л), цинк (в Иртыше – от 0,015 до 0,009 мг/л, в Усолке – от 0,008 до 0,0056 мг/л, в Есиле – от 0,018 до 0,011 мг/л, в Акбулаке – от 0,022 до 0,014 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,015 до 0,010 мг/л), железо (в Иртыше – от 0,500 до 0,368 мг/л, в Усолке – от 0,382 до 0,185 мг/л, в Есиле – от 0,940 до 0,628 мг/л, в Акбулаке – от 0,561 до 0,296 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,678 до 0,357 мг/л) и марганец (в Иртыше – от 0,007 до 0,0059 мг/л, в Усолке – от 0,008 до 0,0064 мг/л, в Есиле – от 0,041 до 0,028 мг/л, в Акбулаке – от 0,022 до 0,014 мг/л и Нуре-Есиль – от 0,035 до 0,023 мг/л).

Следующим этапом работы было проведение оценки эффективности применения микроводорослей в очистке водоемов, загрязненных различными поллютантами в результате альголизации проб воды штаммами *Chlorella vulgaris* И 2 и *Parachlorella kessleri* У 1 (таблица 3).

Установлено, что эффективность очистки штаммом *Chlorella vulgaris* И 2 по нитратам составила от 30 до 62,5 %, по аммонийному солевому от 48 до 65,7 %, по меди от 28,6 до 60,7 %, по нитратам от 27,6 до 40,5 %, по железу от 23,4 до 38,7 %, по сульфатам от 15,9 до 25,6 %, по марганцу от 3,8 до 22,7 %, по цинку от 13,3 до 20 %, по магнию от 16,7 до 18,8 %, по хлоридам от 0,8 до 5,6 % в целом по всем водоемам.

Эффективность очистки штаммом *Parachlorella kessleri* У 1 по показателям была следующая: по нитратам от 40 до 61,1 %, по аммонийному солевому от 31,4 до 57,6 %, по железу от 26,4 до 51,9 %, по меди от 24,1 до 42,9 %, по цинку от 33,3 до 40 %, по нитратам от 29 до 38 %, по марганцу от 20 до 36,4 %, по сульфатам от 8,6 до 20,1 %, по магнию от 3,3 до 12,3 % и по хлоридам от 0,2 до 2,6 % по всем водоемам в целом.

Таблица 3 – Эффективность применения штаммов микроводорослей при очистке загрязненных вод от поллютантов различного происхождения

Показатели	<i>Chlorella vulgaris</i> И 2, %					<i>Parachlorella kessleri</i> У 1, %				
	Иртыш	Усолка	Есиль	Акбулак	Нура-Есиль	Иртыш	Усолка	Есиль	Акбулак	Нура-Есиль
Сульфаты	19,1	21,9	21,2	25,6	15,9	9,6	20,1	16,2	18,4	8,6
Хлориды	4,5	2,3	0,8	5,6	1,8	2,6	0,7	1,2	1,7	0,2
Магний	16,7	16,7	18,8	17,8	17,1	10,0	3,3	9,4	8,2	12,3
Нитриты	50,0	62,5	30,0	50,0	64,3	50,0	50,0	40,0	61,1	50,0
Нитраты	40,5	37,1	27,6	34,0	35,6	29,7	29,0	34,5	38,0	31,1
Аммоний солевой	54,3	56,4	52,9	48,0	65,7	37,1	43,7	57,6	34,4	31,4
Медь	30,8	60,7	33,3	44,8	28,6	34,6	42,9	33,3	24,1	28,6
Цинк	20,0	-	16,7	18,2	13,3	40,0	-	38,9	36,4	33,3
Железо	23,4	38,2	33,5	38,7	29,5	26,4	51,9	33,2	47,2	47,3
Марганец	-	3,8	12,2	22,7	20,0	-	20,0	31,7	36,4	34,3

Следует отметить, что штамм *Chlorella vulgaris* И 2 лучше аккумулировал биогенные элементы и главные ионы, тогда как штамм *Parachlorella kessleri* У 1 лучше аккумулировал тяжелые металлы.

Заключение

Таким образом, внесение биомассы зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* И 2 и *Parachlorella kessleri* У 1 в течение 14 суток привело к снижению концентраций исследуемых поллютантов (включая те поллютанты, которые не превышают пределы ПДК), тем самым улучшая качество воды по всем показателям из групп главных ионов, биогенных элементов и тяжелых металлов. Данные штаммы микроводорослей устойчивы к высоким концентрациям в среде меди, цинка, железа и марганца, а также обладают сорбционной способностью по отношению к ним.

По гидрохимическим показателям качество воды исследованных нами водных объектов

(Иртыш, Усолка, Есиль, Акбулак, Нура-Есиль) относится к 3-му классу и характеризуется «умеренным уровнем загрязнения» водной среды. По БПК₅ качество воды реках Акбулак, Есиль, Усолка и канала Нура-Есиль оценивается как «загрязненная», в реке Иртыш – как «умеренно загрязненная». Кислородный режим воды в норме.

Поступление поллютантов в природный водоем в концентрациях, превышающих предельно-допустимые, приводит к эвтрофированию водоема и гибели водной флоры и фауны [30]. Поэтому, благодаря способности микроводорослей к сорбции тяжелых металлов и деструкции большого спектра органических соединений, появляется возможность проводить процесс эффективной биоочистки загрязненных природных, а также сточных вод от поллютантов различного происхождения, а именно от меди, железа, цинка, марганца, нитритов, солей аммония, нитратов и сульфатов.

Литература

- 1 Заядан Б.К. Роль фототрофных микроорганизмов в мониторинге, функционировании и ремедиации водных экосистем // Автореф. ... докт. биол. наук. – Алматы, 2006. – 34 с.
- 2 Cairns J., Cruber D.A. Comparison of methods and instrumentation of biological early warning systems // Water res. Bull., 1980. – Vol.16, № 2. – P. 261 – 266.
- 3 Haritonidis S., Diapoulis A. Evolution of Greek marine Phanerogam meadows over the last 20 years // Posidonia Newsletter, 1990. – V. 3. – P. 5-10.
- 4 Hutchinson T.C. Comparative studies of the phytotoxicity of heavy metals to phytoplankton and their synergistic interactions // Water Pollution Research in Canada, 1973, V. 8.. – P. 68-89.

- 5 Mirele G., Stokes P.M. Heavy metals tolerance and metal accumulation by planktonic algae // Trace Substances Env. Health. Columbia, 1976. – P. 113-122.
- 6 Rain L.C., Gaur J. P., Kumar H. D. Phycology and heavy metal pollution // Biol. Cambridge Phil. Soc., 1981. – V. 56, № 2. – P. 99-151.
- 7 Андреев Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В. Цианобактерии. – Киев, 1990. – 200 с.
- 8 Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: Учебник. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985. – 376 с.
- 9 Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния. – М.: Мир, 1987. – 285 с.
- 10 Винберг Г.Г., Остапеня П.В., Сивко Т.Н., Левина Р.И. Биологические пруды в практике очистки сточных вод. – Минск: Беларусь, 1966. – С. 231.
- 11 Wong P. T. S., Beaver J. L. Algae biomass assays to determine toxicity of metal mixtures // Hydrobiologia, 1980. – V. 74. – P. 199-208.
- 12 Строганов Н.С. Теоретические аспекты действия пестицидов на водные организмы. Экспериментальная водная токсикология. – Рига: Зинанте, 1979. – В. 5. – С. 11-38.
- 13 Таубаев Т.Т. Хлорелла. – Ташкент: Фан, 1980. – 150 с.
- 14 Ahmad M.R., Winter A. Studies on the hormonal relationships of algae in pure culture. I. The effect of indole-3-acetic acid on the bluegreen and green algae. – Planta, 1968. – V. 78. – № 3. – P. 199-208.
- 15 Brown B. T. and Rattigan B.M. Toxicity of soluble copper and other metal ions to *Elodea Canadensis* // Environmental Pollution, 1979. – V. 20. – P. 303-314.
- 16 Паршикова Т.В. Влияние поверхностно-активных веществ на рост, размножение и функциональную активность водорослей // Дис... канд. биол. наук. Донецк, 1989. – 177 с.
- 17 Zhubanova A.A., Zayadan B.K. The sustainable exploitation and utilization of water resources // Protection Sustainable Development in West China. Xi'an, 2004. – 214 p.
- 18 Сафонова Т.А. Накопление ртути и других тяжелых металлов водорослями и другими водными растениями // Поведение ртути и других тяжелых металлов в экосистемах. – Новосибирск: Изд-во ГПНТБ, 1989. – Ч. 2. – С. 64-90.
- 19 Козенко Э.П., Бабаева М.К., Мадемарова Н.А. Материалы к флоре водорослей отдельных водоемов некоторых областей Казахстана // Ботанические материалы гербария Института ботаники. – Алматы, 1987. – Вып. 15. – С. 124 – 127.
- 20 Сиренко Л.А. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка, 1975. – 247 с.
- 21 Вассер С.П. и др. Водоросли. Справочник. – Киев: Наукова думка, 1989. – 605 с.
- 22 Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – С. 448-450.
- 23 Пименова Е.В. Химические методы анализа в мониторинге водных объектов. – Пермь: Изд-во ФГБОУ ВПО Пермская ГСХА, 2011. – 138 с.
- 24 Шпейзер Г.М., Минеева Л.А. Руководство по химическому анализу вод: Методическое пособие. – Иркутск: Иркут. ГУ, 2006. – 55 с.
- 25 Tills A.R., Alio Way B.J. The speciation of lead in soil solution of very polluted soils // Environmental Technology Letters, 1983. – V. 4. – P. 529-534.
- 26 Магарил Е.Р., Рукавишников И.В. Основы рационального природопользования: Методические указания. – Екатеринбург: УрФУ, 2012. – 44 с.
- 27 Babula P., Adam V., Opatrilova R., Zehnalek J., Havel L., Kizek R. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity // Environ. Chem. Lett. – №6, 2008. – P. 189-213.
- 28 Сан ПиН 2.1.5.980-00 «Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарные правила и нормы" (с изм. от 04.02.2011).
- 29 Кузьмина И.А. Содержание растворенного кислорода в воде: Методические указания. – Великий Новгород: Нов. ГУ, 2007. – 12 с.
- 30 Kvitko K.V., Iankevitch M.I., Dmitrieva I.A. The cooperation of algal and heterotrophic components in oil-polluted wastewaters // UZF-Bericht Microbiology of Polluted Aquatic Ecosystems, 1998. – Vol. 11, № 10. – P. 174 – 181.

References

- 1 Ahmad M.R., Winter A. Studies on the hormonal relationships of algae in pure culture. I. The effect of indole-3-acetic acid on the bluegreen and green algae. *Planta*, vol. 78, № 3. (1968): 199-208.
- 2 Andreyuk E.I., Kopteva ZH.P., Zanina V.V. *Cianobakterii* [Cyanobacteria]. (Kiev, 1990), 200.
- 3 Babula P., Adam V., Opatrilova R., Zehnalek J., Havel L., Kizek R. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity. *Environ. Chem. Lett.*, №6. (2008):189-213.
- 4 Brown B. T. and Rattigan B.M. Toxicity of soluble copper and other metal ions to *Elodea Canadensis*. *Environmental Pollution*, vol. 20. (1979): 303-314.
- 5 Cairns J., Cruber D.A. Comparison of methods and instrumentation of biological early warning systems. *Water res. Bull.*, vol.16, № 2. (1980): 261-266.
- 6 Gusev M.V., Mineeva L.A. *Mikrobiologiya: Uchebnik* [Microbiology: Textbook]. (Moskva: Izd-vo Mosk. un-ta, 1985), 376.

- 7 Haritonidis S., Diapoulis A. Evolution of Greek marine Phanerogam meadows over the last 20 years. *Posidonia Newsletter*, vol. 3. (1990): 5-10.
- 8 Hutchinson T.C. Comparative studies of the phytotoxicity of heavy metals to phytoplankton and their synergistic interactions. *Water Pollution Research in Canada*, vol. 8. (1973): 68-89.
- 9 Kozenko E.P., Babaeva M.K., Mademarova N.A. Materialy k flore vodoroslej ot del'nyh vodoemov nekotoryh oblastej Kazahstana [Materials for the algae flora of certain reservoirs in some regions of Kazakhstan] // *Botanicheskie materialy gerbariya Instituta botaniki*. Vyp. 15. (1987): 124-127.
- 10 Kuz'mina I.A. Soderzhanie rastvorennoho kisloroda v vode: Metodicheskie ukazaniya [Content of dissolved oxygen in water: Methodical instructions]. (Velikij Novgorod: Nov.GU, 2007), 12.
- 11 Kvitko K.V., Iankevitch M.I., Dmitrieva I.A. The cooperation of algal and heterotrophic components in oil-polluted wastewaters. *UZF-Bericht Microbiology of Polluted Aquatic Ecosystems*, vol. 11, № 10. (1998): 174-181.
- 12 Lur'e Yu.Yu. Analiticheskaya himiya promyshlennyh stochnyh vod [Analytical chemistry of industrial wastewater]. (Moskva: Himiya, 1984), 448.
- 13 Magaril E.R., Rukavishnikova I.V. Osnovy racional'nogo prirodopol'zovaniya: Metodicheskie ukazaniya [Fundamentals of environmental management: Guidelines]. (Ekaterinburg: UrFU, 2012), 44.
- 14 Mirele G., Stokes P.M. Heavy metals tolerance and metal accumulation by planktonic algae. *Trace Substances Env. Health. Columbia* (1976): 113-122.
- 15 Mur Dzh.V., Ramamurti S. Tyazhelye metally v prirodnyh vodah. Kontrol' i ocenka vliyaniya [Heavy metals in natural waters. Monitoring and impact assessment]. (Moskva: Mir, 1987), 285.
- 16 Parshikova T.V. Vliyanie poverhnostno-aktivnyh veshchestv na rost, razmozhenie i funkcional'nuyu aktivnost' vodoroslej [The effect of surfactants on the growth, degradation and functional activity of algae] // *Dis... kand. biol. nauk. (Doneck, 1989)*, 177.
- 17 Pimenova E.V. Himicheskie metody analiza v monitoringe vodnyh ob'ektov [Chemical analysis methods in monitoring water bodies]. (Perm': Izd-vo FGBOU VPO Permskaya GSKHA, 2011), 138.
- 18 Rain L.C., Gaur J. P., Kumar H. D. Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Cambridge Phil. Soc.*, vol. 56, № 2. (1981): 99-151.
- 19 Safonova T.A. (1989) Nakoplenie rtuti i drugih tyazhelyh metallov vodoroslyami i drugimi vodnymi rasteniyami. Povedenie rtuti i drugih tyazhelyh metallov v ehkositemah [Accumulation of mercury and other heavy metals by algae and other aquatic plants. Behavior of mercury and other heavy metals in ecosystems]. Novosibirsk: Izd-vo GPNTB, Ch. 2. (1989): 64-90.
- 20 San PiN 2.1.5.980-00 «Vodootvedenie naselennyh mest, sanitarnaya ohrana vodnyh ob'ektov. Gigienicheskie trebovaniya k ohrane poverhnostnyh vod. Sanitarnye pravila i normy» [Water disposal of populated areas, sanitary protection of water bodies. Hygienic requirements for the protection of surface water. Sanitary rules and regulations]. (s izm. ot 04.02.2011).
- 21 Shpejzer G.M., Mineeva L.A. Rukovodstvo po himicheskomu analizu vod: Metodicheskoe posobie [Chemical Analysis Guide: Methodology]. (Irkutsk: Irkut. GU, 2006), 55.
- 22 Sirenko L.A. i dr. Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovaniya vodoroslej v gidrobiologicheskoy praktike [Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice]. (Kiev: Naukova dumka, 1975), 247.
- 23 Stroganov N.S. Teoreticheskie aspekty dejstviya pesticidov na vodnye organizmy. EHksperimental'naya vodnaya toksikologiya [Theoretical aspects of the action of pesticides on aquatic organisms. Experimental Water Toxicology]. Riga: Zinante, V. 5. (1979): 11-38.
- 24 Taubaev T.T. Hlorella [Chlorella]. (Tashkent: Fan, 1980), 150.
- 25 Tills A.R., Alio Way B.J. The speciation of lead in soil solution of very polluted soils. *Environmental Technology Letters*, vol. 4. (1983): 529-534.
- 26 Vasser S.P. i dr. Vodorosli. Spravochnik [Seaweed. Directory]. (Kiev: Naukova dumka, 1989), 605.
- 27 Vinberg G.G., Ostapenya P.V., Sivko T.N., Levina R.I. Biologicheskie prudy v praktike ochistki stochnyh vod [Biological ponds in the practice of wastewater treatment]. (Minsk: Belarus', 1966), 231.
- 28 Wong P. T. S., Beaver J. L. Algae biomass assays to determine toxicity of metal mixtures. *Hydrobiologia*, vol. 74. (1980): 199-208.
- 29 Zayadan B.K. Rol' fototrofnih mikroorganizmov v monitoringe, funkcionirovanii i remediacii vodnyh ehkositem [The role of phototrophic microorganisms in the monitoring, functioning and remediation of aquatic ecosystems] // *Avtoref. ... dokt. biol. nauk. (Almaty, 2006)*, 34.
- 30 Zhubanova A.A., Zayadan B.K. The sustainable exploitation and utilization of water resources. *Protection Sustainable Development in West China*. Xi'an (2004): 214.

**Хасенова Э.Ж.¹, Аюпова А.Ж.²,
Сембаева Д.Ж.³, Сарсенова А.С.⁴, Молдагулова Н.Б.⁵,
Дуамбеков М.С.⁶**

¹e-mail: elmira_alta@mail.ru

²e-mail: a.ibraeva@mail.ru

³e-mail: sembaeva_1981@mail.ru

⁴e-mail: sarainur@mail.ru

⁵e-mail: m_nazira1967@mail.ru

⁶e-mail: mae_astana@mail.ru

^{1,2,4,6}Учреждение «Международная академия экологии», Казахстан, г. Астана

^{3,5}ТОО «Экостандарт.kz», Казахстан, г. Астана

СКРИНИНГ АКТИВНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ КОМПСТИРОВАНИЯ ИЛОВОГО ОСАДКА СТОЧНЫХ ВОД

Компостирование ОСВ, навоза и птичьего помета является одним из методов биоконверсии органических отходов, с помощью которого можно получить экологически чистое эффективное удобрение. Наиболее рациональным способом решения данной проблемы является компостирование сброженного осадка методом твердофазной аэробной ферментации. Целью работы является скрининг активных штаммов для компостирования илового осадка сточных вод. Выделены мезофильные и термофильные бактерии из иловых осадков и сточных вод из проб, отобранных из канализационно-очистных сооружений г. Астаны и г. Караганды для переработки методом компостирования иловых осадков сточных вод с целью получения органического удобрения.

Проведен скрининг активных штаммов микроорганизмов по ферментативной активности для компостирования илового осадка сточных вод. Проведена оценка ферментативной активности выделенных штаммов (липазная, амилазная, протеолитическая, целлюлолитическая, деструктивная по отношению к нефти и ПАВ). На основании результатов было отобрано 13 наиболее активных штаммов.

В результате проведения фенотипической и генетической идентификации выделенные микроорганизмы отнесены к различным физиологическим группам: *Bacillus fusiformis*, *Pseudomonas lundensis*, *Bacillus amyloligifaciens*, *Bacillus mojavensis*, *Enterobacter* sp., *Bacillus pumilus*, *Ochrobactrum* sp., *Bacillus coagulans*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*.

Таким образом, в результате проведенных исследований были выделены микроорганизмы и проведен скрининг активных штаммов микроорганизмов для компостирования илового осадка сточных вод.

Ключевые слова: микроорганизмы, иловые осадки, компостирование, сточные воды.

Khasenova E.Zh.¹, Ayupova A.Zh.², Sembaeva D.Zh.³,
Sarsenova A.S.⁴, Moldagulova N.B.⁵, Duambekov M.S.⁶

¹e-mail: elmira_alta@mail.ru

²e-mail: a.ibraeva@mail.ru

³e-mail: sembaeva_1981@mail.ru

⁴e-mail: sarainur@mail.ru

⁵e-mail: m_nazira1967@mail.ru

⁶e-mail: mae_astana@mail.ru

^{1,2,4,6}Establishment of the International Academy of Ecology, Kazakhstan, Astana,

^{3,5}«Ecostandart.kz» LLP, Kazakhstan, Astana

Screening of active strains of microorganisms for composting sewage sludge

Composting WWS, manure and poultrymanure is one of the methods of bioconversion of organic waste, with which you can get environmentally friendly effective fertilizer. The most rational way to solve this problem is the composting of fermented sludge by solid-phase aerobic fermentation. The aim of the work is to screen active strains for composting sewage sludge. Mesophilic and thermophilic bacteria were isolated from sludge and sewage from samples taken from sewage treatment plants in Astana and Karaganda for processing by composting sewage sludge to produce organic fertilizer.

Screening of active strains of microorganisms by enzymatic activity for composting sludge from sewage was carried out. The enzyme activity of the isolated strains was evaluated (lipase, amylolytic, proteolytic, cellulolytic, destructive with respect to oil and surfactant). Based on the results, 13 of the most active strains were selected.

As a result of phenotypic and genetic identification, the isolated microorganisms were assigned to different physiological groups: *Bacillus fusiformis*, *Pseudomonas lundensis*, *Bacillus amyloligifaciens*, *Bacillus mojavensis*, *Enterobacter* sp., *Bacillus pumilus*, *Ochrobactrum* sp., *Bacillus coagulans*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*.

Thus, as a result of the research, microorganisms were isolated and screening of active strains of microorganisms was carried out for composting sludge from wastewater.

Key words: microorganisms, sludge sediments, composting, wastewater.

Хасенова Э.Ж.¹, Аюпова А.Ж.², Сембаева Д.Ж.³,
Сарсенова А.С.⁴, Молдагулова Н.Б.⁵, Дуамбеков М.С.⁶

¹e-mail: elmira_alta@mail.ru

²e-mail: a.ibraeva@mail.ru

³e-mail: sembaeva_1981@mail.ru

⁴e-mail: sarainur@mail.ru

⁵e-mail: m_nazira1967@mail.ru

⁶e-mail: mae_astana@mail.ru

^{1,2,4,6}«Халықаралық экология академия» мекемесі, Қазақстан, Астана қ.

^{3,5}«Экостандарт.kz» ЖШС, Қазақстан, Астана қ.

Ағынды сулардың шламын компостациялау үшін микроорганизмдердің белсенді штамдарының скринингі

Ағын сулардың тұнбаларын, көң мен құстардың саңғырықтарын қордаландыру – органикалық қалдықтарды биоконверсиялаудың бір әдісі, сол арқылы экологиялық таза, сонымен қатар тиімді тыңайтқыш алуға мүмкіндік бар. Осы мәселені шешудің ең тиімді жолы қаттыфазалы аэробты ферментация арқылы ашытылған тұнбаны қордаландыру. Жұмыстың мақсаты – ағын сулардың тұнбаларын қордаландыру үшін белсенді штамдарды іріктеу. Астана мен Қарағанды қалаларындағы көріз тазарту мекемелерінен алынған ағын сулар мен лайлы тұнба сынақтарынан мезофильді және термофильді бактериялар бөлініп алынды. Бөлініп алынған бактериялар көмегімен органикалық тыңайтқыштарды алу мақсатта ағын сулардың лайлы тұнбаларын қордаландыру әдісі жүзеге асады.

Ағын сулардың лайлы тұнбаларын қордаландыру үшін ферментативті белсенділігі арқылы белсенді микроағзалар штамдарына іріктеу жасалды. Бөлініп алынған белсенді штамдарға ферментативтік белсенділікке баға беру (липазды, амилолитикалық, протеолитикалық, целлюлолитикалық, мұнай мен ББЗ ыдырату қабілеті) жұмыстары жүргізілді. Алынған нәтижелер негізінде 13 аса белсенді штамдар таңдалды.

Фенотипті және генетикалық сәйкестендіру жүргізілгеннен кейін бөлініп алынған микроағзалар келесі физиологиялық топтарға жатқызылды: *Bacillus fusiformis*, *Pseudomonas lundensis*, *Bacillus amyloligiefaciens*, *Bacillus mojavensis*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus pumilus*, *Ochrobactrum sp.*, *Bacillus coagulans*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*. Қорыта келгенде, жүргізілген зерттеулер нәтижесінде ағын сулардың лайлы тұнбаларын қордаландыру үшін микроағзалар бөлініп алып, белсенді микроағзалар штамдары іріктеліп алынды.

Түйін сөздер: микроағзалар, лайлы тұнба, қалдықтарды қордаландыру, ағын су.

Введение

В настоящее время загрязнение окружающей среды, особенно в городах, достигает критической отметки. В процессе очистки сточных вод на очистных сооружениях накапливаются отходы. Одним из основных видов отходов являются осадки сточных вод (ОСВ), которые можно использовать при грамотном подходе как вторичные ресурсы [1-6].

Лучшим решением проблемы утилизации отходов на сегодняшний день является биотехнологический метод компостирования [6-9]. Компостирование осадков – биотермический процесс разложения органических веществ осадков сточных вод, осуществляемый под действием аэробных микроорганизмов с целью обеззараживания, снижения влажности, стабилизации и подготовки осадков к утилизации в качестве удобрения [10-13]. Процесс компостирования представляет собой обработку отходов специально подобранными композициями полезных эффективных мезо- и термофильных бактерий. В результате разложения смеси различных органических веществ микроорганизмами получается удобрения, применяемое в сельском хозяйстве [14-18].

Для ускорения переработки обезвоженного осадка сточных вод в экологически чистый продукт биотехнологическим методом очень важно внесение в ОСВ активных штаммов микроорганизмов, способных к разложению сложных органических веществ в более простые, удалению запаха, снижению патогенной микрофлоры.

Целью работы является скрининг активных штаммов микроорганизмов для компостирования илового осадка сточных вод.

Материалы и методы исследований

Материалы исследований: городские сточные воды, илы КОС г. Астана и г. Караганда. Микроорганизмы различных таксономических групп.

Методы исследований. Питательные среды: мясо-пептонный бульон, Nutrient Broth (Himedia), Nutrient agar (Himedia), *Pseudomonas* agar, *Lactobacillus* MRS agar, *Lactobacillus* MRS Broth, Сабуро agar.

Выделение микроорганизмов из проб осадков сточных вод и различных органических отходов проводили методом накопительных культур на питательных средах СПБ, МПБ, МРС-бульон, Сабуро [19-21]. Для выделения мезофильных бактерий инкубацию культур производили при 37°C в течение 48-72 часов. Для выделения и скрининга термофильных бактерий инкубацию культур производили при 50°C в течение 48-72 часов. Чистые культуры аэробных микроорганизмов пересевали методом истощающего штриха по Гоулду [22-24].

Чистоту выделенных культур микроорганизмов оценивали общепринятыми методами – микроскопическим контролем по Грамму и высевом на среду МПА.

Идентификацию микроорганизмов проводили генотипированием по консервативному локусу *16S r DNA* [25]. Выделение ДНК из бактериальных клеток проводили методом Вильсона. Амплификация фрагмента *16S rRNA* гена. Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCT-CAg-3 и 806R- 5' ggACTACCAgggTATCTAAT в общем объеме 20 мкл. ПЦР смесь содержала 150 нг ДНК, 1Ед. **Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase** (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 7 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C- 40, 72°C – 1 минута; заключительная элонгация 7 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора **GeneAmp PCR System 9700** (Applied Biosystems).

Определение нуклеотидной последовательности. Очистку ПЦР продуктов от не связавшихся праймеров проводили ферментативным методом используя, **Exonuclease I (Fermen-**

tas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas).

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Результаты исследований

Отбор проб ила и сточной воды из отстойников вторичной очистки проводили на станциях очистных сооружений ГКП «Астана су арнасы» г. Астаны, очистных сооружений г. Караганды и различных органических отходов.

Всего было выделено 71 изолят, из которых к бактериям было отнесено 56 изолятов, что со-

ответствует 79% от общего количества выделенных микроорганизмов, 8 изолятов (12%) отнесено к актиномицетам и 7 культур (10%) – к дрожжам (рисунок 1).

Из выделенных изолятов 6 культур обладали способностью к росту при высоких температурах, 5 из которых отнесены к бактериальным культурам и 1 к дрожжам. Для отбора микроорганизмов, способных к переработке ОСВ, все выделенные в чистую культуру микроорганизмы (рисунок 2) были проверены на ферментативную активность (каталазная, оксидазная, протеолитическая, липолитическая, целлюлозолитическая, амилазная). Данные ферменты играют основную роль в ускорении разложения органических отходов. Также проведены исследования по изучению способности культур микроорганизмов к росту на иловых осадках сточных вод.

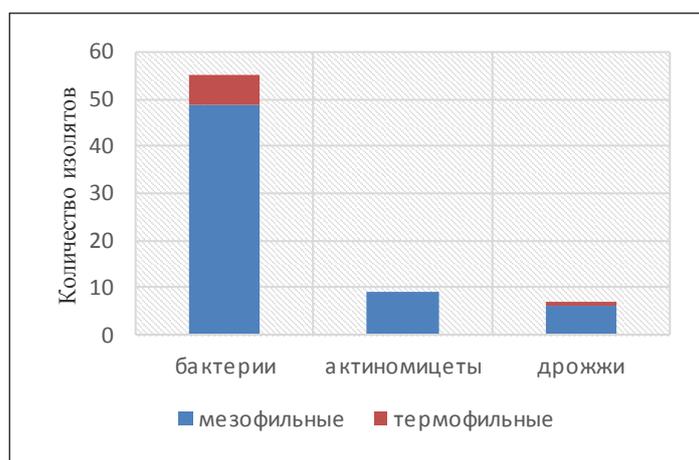


Рисунок 1 – Количество выделенных микроорганизмов



культура И12



культура С7

Рисунок 2 – Рост чистых колоний микроорганизмов на питательной среде СПА, выделенных из органических отходов и сточных вод

Липазная активность обнаружена у 20 культур микроорганизмов, 14 культур расщепляли казеин на молочном агаре. Гидролиз крахмала (амилолитическая активность) обнаружена у 24

культур, размеры зоны гидролиза колебались в пределах 0,6-1,8 мм (таблица 1). Каталазная активность отмечена у 35 культур микроорганизмов, оксидазная у 44 изолятов.

Таблица 1 – Ферментативная активность выделенных микроорганизмов

Ферментативная активность	Бактерии	Дрожжи	Актиномицеты
Каталазная	25	6	4
Оксидазная	35	4	5
Протеолитическая	9	3	2
Липолитическая	16	3	1
Целлюлолитическая	13	2	3
Амилолитическая	17	5	2

При культивировании микроорганизмов на жидкой среде Гетчинсона с добавлением фильтровальной бумаги 18 культур проявили способность разрушать целостность фильтровальной бумаги и образовывать хлопьевидное помутнение среды.

По результатам экспериментов выявлено 17 бактериальных культур с высокой ферментативной активностью. Для отбора наиболее активных бактерий нами был проведен учет способности и скорости роста микроорганизмов на обезвоженном иле. Для этого ил стерилизовали 3-х кратным автоклавированием при 0,5 атм. и засеивали исследуемыми культурами микроорганизмов. Из 17 культур на обезвоженном иле наличие роста клеток было выявлено у 13 культур микроорганизмов, при этом наибольшей скоростью роста обладали культуры ЭИ4, С20, ЭИ14. На основе полученных данных для дальнейших исследований нами было отобрано 13 культур – ЭИ4, ЭИ1К, ЭИ14, ЭИ15, ЭИРs, ЭИЗ, П-1-5, П-1-6, И5, П-1-3, П-1-2, П-1-2, С20, ЭЖ.

Далее изучали культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки отобранных культур. Культурально-морфологические характеристики отобранных штаммов представлены в таблице 2.

Изучение биохимических свойств микроорганизмов показало, что 8 культур – уреазоположительные, 9 – оксидазоположительные, 11 – каталазоположительные, 5 – не разжижают желатин, 7 культур не дезаминируют фенилала-

нин. Все изученные культуры микроорганизмов кроме 1 не образовывали индол, 4 культуры не восстанавливали нитраты, не образовывали сероводород и 6 не образовывали аммиак. По отношению к углеводам 2 культуры не усваивают сахарозу, лактозу, инозит, арабинозу; 3 культуры не усваивают сорбитол, ксилозу, фруктозу; 4 культуры не усваивают трегалозу, галактозу, маннозу; 6 культур не усваивают мальтозу; 2 культуры не усваивают глюкозу (таблица 3).

Видовую принадлежность активных изолятов определяли генотипированием по консервативному локусу *16S r RNA*.

Для построения филогенетических деревьев использовали программное обеспечение Mega 3.1. Использовали алгоритм ClustalW для выравнивания нуклеотидных последовательностей, построение древ проводили с использованием метода присоединения ближайших соседей (Neighbor-JoiningNJ)

Учитывая максимальный процент совпадения анализируемой последовательности в международной базе данных по алгоритму BLAST, а также результатов филогенетического анализа (рисунок 3) установлено, что образцы: ЭИ1К относятся к *Bacillus mojavensis*, штамм С20 относится к *Bacillus subtilis*, П-1-6 относится к *Bacillus licheniformis*, ЭИ15 относится к *Bacillus amyloliquefaciens*, ЭИЗ относится к *Bacillus pumilus*, П-1-5 относится к *Bacillus coagulans*, ЭЖ относятся к *Bacillus clausii*, ЭИ14 относятся к *Bacillus fusiformis*.

Таблица 2 – Макро-и микроморфология активных культур

Изолят	Макроморфология	Микроморфология
1	2	3
ЭИ4	колонии круглые и неправильной формы, средние и крупные, широко распространяющиеся по поверхности среды, выпуклые, плоские, пастообразные, мягкой консистенции	клетки прямые, располагаются одиночно, парами или короткими цепочками, грамположительные.
ЭИ1К	колонии бесцветные, красные, круглые, профиль плоский, гладкие, матовые, с ровными краями, мягкой консистенции, с плоским профилем, размер колоний 0,5-1 мкм.	грамотрицательные палочки, короткие, расположенные в виде цепочек, одиночно, парами
ЭИ14	колонии неправильной формы, с плоским профилем, гладкие, выпуклые, бежевого, серого цвета, диаметром 08-1 мкм	грамотрицательные палочки, 0,3-0,6 мкм, расположены в виде скоплений, соединенные парами
ЭИ15	круглые, плоские колонии, молочного цвета с выраженным центром, диаметром 2 мм и меньше, с неровными краями	грамположительные кокки, встречаются в виде коротких цепочек, расположение различное
ЭИРs	колонии белые, круглые, плоские, блестящие, с ровными краями, профиль выпуклый. Размер колоний 0,5- 1 мм	грамотрицательные палочки, встречаются кокковидные короткие одиночные формы
ЭИ3	колонии зернистые с выступающим плотным центром, края неровные.	крупные грамположительные аэробные палочки, скопления клеток в виде цепочек
П-1-5	круглые, непигментированные колонии, блестящие, с ровным краем	грамположительные палочки; клетки прямые, образуют цепочки
П-1-6	колоний морщинистую форму с обильным образованием слизи и выделением розоватого пигмента.	грамположительные палочки, расположены в цепочки
И5	на плотной питательной среде MRS колонии непрозрачные, белого цвета, блестящие, круглые по форме с выпуклой бугристой поверхностью, края неровные	клетки грамположительные, палочки средней длины, с закругленными концами, складываются в длинные цепочки
П-1-3	колонии с желтоватым оттенком, края неровные, консистенция однородная	грамотрицательные, клетки прямые палочковидные. Располагаются одиночно, попарно или короткими цепочками. Подвижные
П-1-2	образование колоний одинаковых размеров, слизистые бежевого цвета	прямые подвижные грамотрицательные палочки
С20	колонии сухие, морщинистые, бесцветные с волнистыми краями, вязкой консистенции	грамположительные палочки, расположенные одиночно, попарно или цепочкой
ЭЖ	колонии морщинистые, бесцветные с волнистыми краями, вязкой консистенции	прямые палочковидные бактерии, подвижные

Таблица 3 – Физиолого-биохимические признаки активных штаммов

Тест \ Штамм	ЭИ4	ЭИ1К	ЭИ14	ЭИ15	ЭИРs	ЭИ3	П-1-5	П-1-6	И5	П-1-3	П-1-2	ЭЖ	С20
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Оксидаза	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Уреаза	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Разжижение желатина	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Фенилаланин	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Образование сероводорода	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Продолжение таблицы 3

Тест \ Штамм	ЭИ4	ЭИК	ЭИ14	ЭИ15	ЭИРs	ЭИ3	П-1-5	П-1-6	И5	П-1-3	П-1-2	ЭЖ	С20
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Образование аммиака	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
Образование индола	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Отношение к температуре													
-5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+28°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+45°C	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Сахароза	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Инозит	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Арабиноза	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Сорбитол	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Ксилоза	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
Трегалоза	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Галактоза	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Манноза	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Мальтоза	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

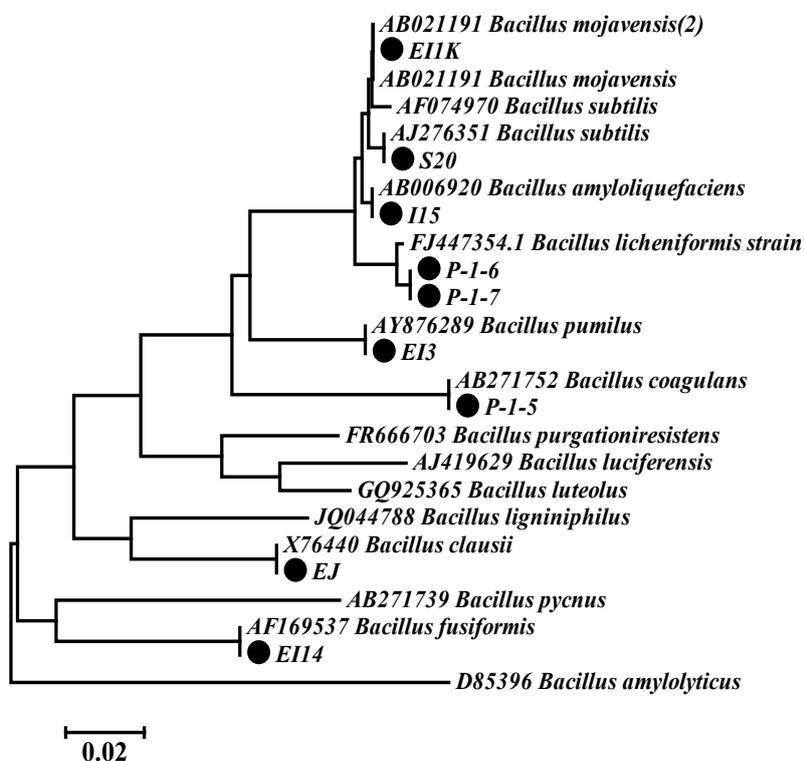


Рисунок 3 – Положение бактерий, выделенных из сточных вод и илов в филогенетическом дереве бацилл

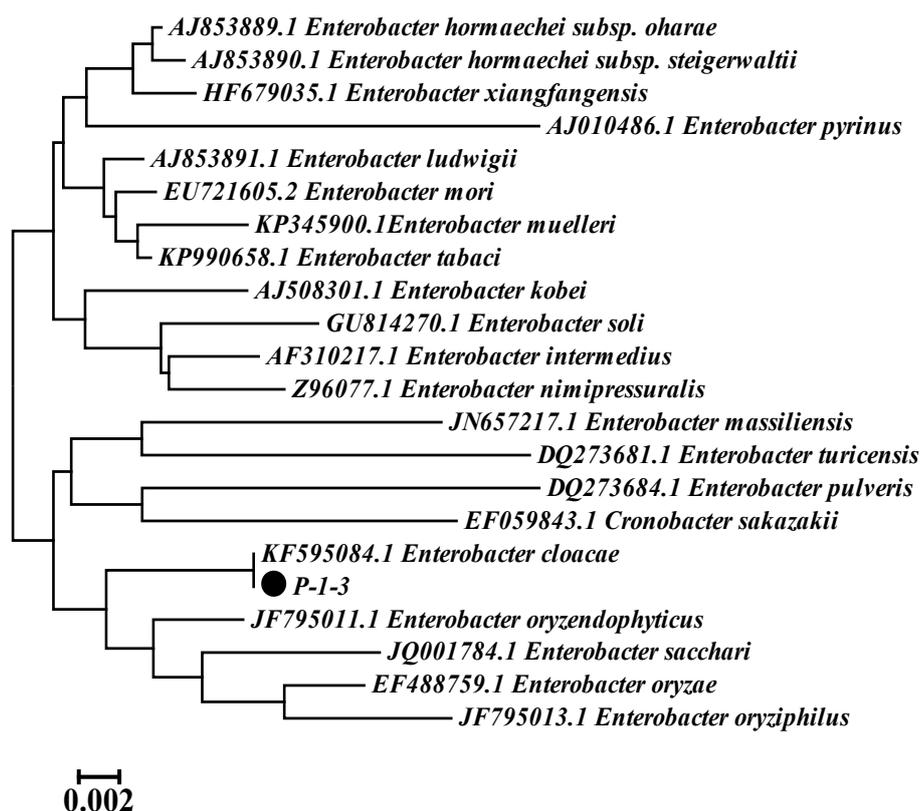


Рисунок 4 – Положение бактерий, выделенных из пластовых вод в филогенетическом дереве энтеробактерий

На рисунке 4 видно, что последовательность образца: П-1-3 расположена на одной ветви с *Enterobacter cloacae*. Учитывая максимальный процент совпадения анализируемой последовательности в международной базе данных по алгоритму BLAST, а также результатов филогенетического анализа установлено, что образец П-1-3 относится к *Enterobacter cloacae*.

По результатам филогенетического анализа установлено, что образец ЭИ4 относится к *Pseudomonas lundensis* (рисунок 5).

На рисунке 6 видно, что последовательность образца: И5 расположена на одной ветви с *Lactobacillus paracasei*. В таблице 4 приведены результаты идентификации штаммов микроорганизмов.

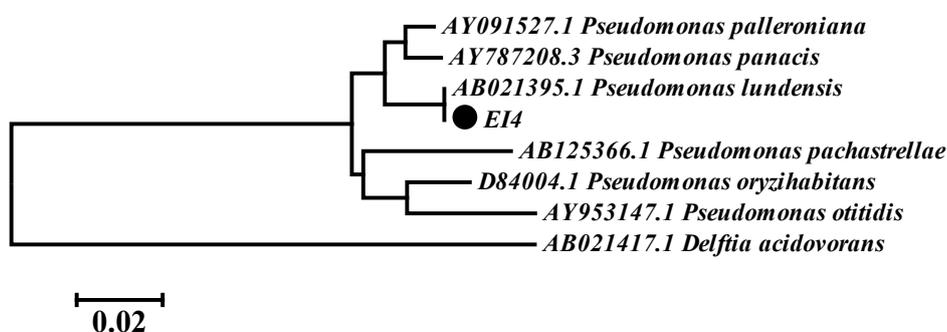


Рисунок 5 – Положение бактерий, выделенных из пластовых вод в филогенетическом дереве псевдомонад

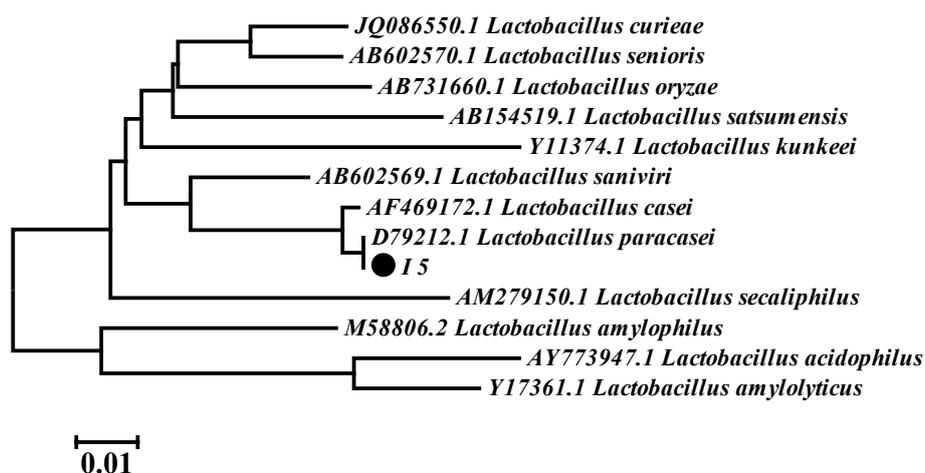


Рисунок 6 – Положение бактерий, выделенных из пластовых вод в филогенетическом дереве лактобацилл

Таблица 4 – Результаты идентификации штаммов по фрагменту 16Sr RNA гена

Наименование изолятов	Результат идентификации	Гомология, %
ЭИ4	<i>Pseudomonas lundensis</i>	100
ЭИ1К	<i>Bacillus mojavenis</i>	99
ЭИ14	<i>Bacillus fusiformis</i>	100
ЭИ15	<i>Bacillus amyloliguefaciens</i>	99
ЭИРs	<i>Ochrobactrum sp.</i>	98
ЭИЗ	<i>Bacillus pumilus</i>	100
П-1-5	<i>Bacillus coagulans</i>	99
П-1-6	<i>Bacillus licheniformis</i>	99
И5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99
П-1-3	<i>Enterobacter cloacae</i>	100
П-1-2	<i>Enterobacter sp.</i>	98
С20	<i>Bacillus subtilis</i>	98
ЭЖ	<i>Bacillus clausii</i>	99

Выводы

В результате проведенных исследований из иловых осадков и сточных вод были выделены различные микроорганизмы. Изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства бактерий. По макро- и микроморфологическим свойствам выделенные культуры принадлежат к группе грампозитивных и грамотрицательных микроорганизмов.

Проведена оценка ферментативной активности выделенных штаммов (липазная, амилолитическая, протеолитическая, целлюлолитическая). На основании результатов было отобрано 13 наиболее активных штаммов.

В результате проведения фенотипической и генетической идентификации выделенные микроорганизмы отнесены к различным физиологическим группам: *Bacillus fusiformis*, *Pseudomonas lundensis*, *Bacillus amyloliguefaciens*, *Bacillus mojavenis*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus pumilus*, *Ochrobactrum sp.*, *Bacillus coagulans*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*.

Таким образом, в результате проведенных исследований были выделены микроорганизмы, перспективные для компостирования илового осадка сточных вод. Выделенные микроорганизмы можно использовать для получения органического удобрения методом твердофазной ферментации.

Литература

- 1 Михайлов Л.Н., Пужайкин И.В., Марковская М.П., Марковская Г.К. Научные основы применения осадков городских сточных вод в качестве удобрения. – Самара: Кн. изд-во, 1998. – 160 с.
- 2 Корчевская Ю.В., Кадысева А.А., Горелкина Г.А., Маджугина А.А., Троценко И.А. Обезвреживание отходов методом экологической биотехнологии // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2016, №3 (137). – С.170-171.
- 3 Никовская Г.Н., Калининченко К.В. Биотехнология утилизации осадков муниципальных сточных вод // Biotechnol. Acta – 2014. Т.7 – №3.
- 4 Пахненко Е.П. Осадки сточных вод и другие нетрадиционные органические удобрения. – М. Бином, 2015. – 26-32.
- 5 Туровский И.М. Осадки сточных вод. Обезвоживание и обеззараживание. – М.: ДеЛи принт, 2008. С.376.
- 6 Калюжный С.В. Очистка сточных вод. Москва, 2006. – 479 с.
- 7 Кальгин А.А., Павлинова И.Г. Экологическая безопасность городов: монография. – М.: Изд-во МГАКХиС. – 2009. С.295-297.
- 8 Шуравилин А.В., Сурикова Н.В. Опыт удобрения почв осадком сточных вод в Московской области // Агрохимический вестник, 2006, № 1. – С. 24-27.
- 9 Большеева Т.Н., Валитова А.Р., Кижаккин П.П., Касатиков В.А. Результаты утилизации осадков сточных вод во Владимирской области // Агрохимический вестник, 2006, № 1. – С. 28-29.
- 10 Похил Ю.Н., Багаев Ю. Г., Иванов Н.А., Иванова М.Г. Обезвоживание кондиционированных осадков коммунальных сточных вод городов Сибири. // Тезисы шестого междунар. конгресса «Вода: экология и технология» Экватэк-2006, Москва, 2006. – с. 780.
- 11 Правкина С.Д., Карякин А.В., Левин В.И., Хабарова Т.В. Способ получения органоминерального удобрения из осадков сточных вод с помощью компостирования. Пат. 2489414 Российская Федерация.
- 12 Карякина С.Д., Карякин А.В., Касатиков В.А. Агроэкологическая эффективность аэробного компостирования осадков сточных вод при производстве органических удобрений. // Проблемы агрохимии и экологии. – 2014. – №3. – С.14-18.
- 13 Воронов Ю.В. Водоотведение и очистка сточных вод. Москва, 2004. – 702 с.
- 14 Капустин В.П., Уйменов А.В. Переработка отходов животноводства и птицеводства вопросы современной науки и практики // Университет им. В.И. Вернадского. – 2007. – Т.2, №4 (10). – С. 23-26.
- 15 Худякова Л. ЭМ-технологии – или эффективные микроорганизмы. – Абаканский Центр природного Земледелия: «Сияние», 2014. С.10-15.
- 16 Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.А. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. //М. «Наука». – 1966. – С.17-19.
- 17 Неклюдов А.Д., Федотов Г.Н., Иванкин А.Н. Интенсификация процесса компостирования при помощи аэробных микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. 2008, №1. С. 9-11.
- 18 Сухамера С.А. ЭМ-технология – биотехнология XXI века. // Сборник материалов по практическому применению препарата «Байкал ЭМ-1». – Алматы, 2006. – С. 6-15.
- 19 Нетрусов А.И. Егорова М.А. Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд-во Академия, 2005. – 608 с.
- 20 Егорова Н.С. Промышленная микробиология: учебное пособие / под ред. З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина. – М.: Высш.школа, 1989. – С.20-29.
- 21 Лысак В.В. Микробиология: учебное пособие. – Минск: БГУ, 2007. – С. 36.
- 22 Прунтова О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – Владимир, Изд-во ВлГУ, 2005. С.13-20.
- 23 Нетрусов А. И., Котова И. Б. Микробиология. – М.: Издательский центр «Академия», 2012. С.50-55.
- 24 Сидоренко О.Д., Войно Л.И., Ванькова А.А. Микробиология. – М.: Изд-во Инфра-М, 2012. С.20-25.
- 25 Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология. – М.: Изд-во МГУ, 2012. С.30-36.

References

- 1 Bolyisheva T.N., Valitova A.R., Kizhakin P.P., Kasatikov V.A. (2006) Rezultaty utilizatsii osadkov stochnyih vod vo Vladimirskoy oblasti [Results of disposal of sewage sludge in the Vladimir region] Agrochemical Bulletin, 2006, No. 1. – P. 28-29.
- 2 Bryuhanov A.L., Rybak K.V., Netrusov A.I. (2012) Molekulyarnaya mikrobiologiya [Molecular Microbiology]. – М.: Publishing House of Moscow State University. P.30-36.
- 3 Egorova N.S. (2007) Promyishlennaya mikrobiologiya: uchebnoe posobie [Industrial Microbiology: study guide] / ed. BEHIND. Arkadieva, A.M. Bezborodov, I.N. Blokhin. – М.: Higher School. – P.20-29.
- 4 Hudyakova L. (2014) EM-tehnologii – ili effektivnyie mikroorganizmy [EM technologies – or effective microorganisms]. – Abakan Center for Natural Farming: "Shining". P.10-15.
- 5 Kalgin A.A., Pavlina I.G. (2009) Ekologicheskaya bezopasnost gorodov: monografiya [Ecological safety of cities: monograph]. – М.: Izd-vo MGAkHiS. P.295-297.
- 6 Kalyuzhnyi S.V. (2006) Ochistka stochnyih vod [Cleaning of drains]. Moscow. – 479 p.
- 7 Kapustin V.P., Uyemenov A.V. (2007) Pererabotka othodov zhitovodstva i ptitsevodstva voprosy sovremennoy nauki i praktiki [Processing of livestock and poultry waste issues of modern science and practice] // University. IN AND. Vernadsky. – Vol. 2, No. 4 (10). – С. 23-26.

- 8 Karyakina S.D., Karyakin A.V., Kasatkov V.A. (2014) Agroekologicheskaya effektivnost aerobnogo kompostirovaniya osadkov stochnykh vod pri proizvodstve organicheskikh udobreniy [Agri-environmental effectiveness of aerobic composting of sewage sludge in the production of organic fertilizers]. *Problems of agrochemistry and ecology*. – №3. – С14-18.
- 9 Korchevskaya Yu.V., Kadyiseva A.A., Gorelkina G.A., Madzhugina A.A., Trotsenko I.A (2016) Obezvrezhivanie othodov metodom ekologicheskoy biotekhnologii. [Ecological biotechnology waste disposal] *Herald of the Altai State Agrarian University*, No. 3 (137). – P.170-171.
- 10 Loginova L.G., Golovacheva R.S., Egorova L.A. (1966) Zhizn mikroorganizmov pri vyisokih temperaturah [The life of microorganisms at high temperatures]. // *M. "The science"*. – pp. 17-19.
- 11 Lyisak V.V. (2007) *Mikrobiologiya: uchebnoe posobie* [Microbiology: study guide]. – Minsk: BSU. – p. 36.
- 12 Mihaylov L.N., Puzhaykin I.V., Markovskaya M.P., Markovskaya G.K. (1998) *Nauchnyye osnovy primeneniya osadkov gorodskikh stochnykh vod v kachestve udobreniya* [The scientific basis for the use of urban sewage sludge as fertilizer] Samara: Prince. publishing house. – 160 p.
- 13 Neklyudov A.D., Fedotov G.N., Ivankin A.N. (2008) *Intensifikatsiya protsessa kompostirovaniya pri pomoschi aerobnykh mikroorganizmov* [Intensification of the composting process using aerobic microorganisms] // *Applied biochemistry and microbiology*. №1. Pp. 9-11.
- 14 Netrusov A. I., Kotova I. B. (2012) *Mikrobiologiya* [Microbiology]. – М.: Publishing Center "Academy". P. 50-55.
- 15 Netrusov A.I. Egorova M.A. Zaharchuk L.M. (2005) *Praktikum po mikrobiologii: ucheb. posobie dlya stud. vyssh. ucheb. zavedeniy voda* [Workshop on Microbiology: studies. allowance for stud. higher studies. institutions] / ed. A.I. Netrusova. – М.: Academy Publishing House. – 608 с.
- 16 Nikovskaya G.N., Kalinichenko K.V. (2014) *Biotekhnologiya utilizatsii osadkov munitsipalnykh stochnykh vod* [Biotechnology of utilization of municipal sewage sludge] *Biotechnol.Acta*. T.7 – №3.
- 17 Pahnenko E.P. (2015) *Osadki stochnykh vod i drugie netraditsionnyye organicheskie udobreniya* [Sewage sludge and other unconventional organic fertilizers]. – М. Binom. – 26-32.
- 18 Pohil Yu.N., Bagaev Yu. G., Ivanov N.A., Ivanova M.G. (2006) *Obezvrezhivanie konditsionirovannykh osadkov kommunalnykh stochnykh vod gorodov Sibiri* [Dehydration of conditioned sewage sludge from Siberian cities]. Abstracts of the sixth international. of the congress "Water: Ecology and Technology" Equvatek, Moscow, 2006. – p. 780.
- 19 Pravkina S.D., Karyakin A.V., Levin V.I., Habarova T.V. *Sposob polucheniya organomineralnogo udobreniya iz osadkov stochnykh vod s pomoschyu kompostirovaniya* [The method of obtaining organic fertilizer from sewage sludge using composting]. Pat 2489414 Russian Federation.
- 20 Pruntova O.V. (2005) *Laboratorniy praktikum po obschey mikrobiologii* [Laboratory Workshop on General Microbiology]. – Vladimir, VISU Publishing House. P.13-20.
- 21 Shuravilin A.V., Surikova N.V. (2006) *Opyit udobreniya pochv osadkom stochnykh vod v Moskovskoy oblasti* [Experience in soil fertilization with sewage sludge in the Moscow Region] *Agrochemical Bulletin*, No. 1. – P. 24-27.
- 22 Sidorenko O.D., Voyno L.I., Vankova A.A. (2012) *Mikrobiologiya* [Microbiology]. – М.: Publishing house Infra. – М. P.20-25.
- 23 Suhamera S.A. (2006) *EM-tehnologiya – biotekhnologiya X X I veka* [EM technology – biotechnology X X I century]. Collection of materials on the practical use of the drug "Baikal EM-1." – Almaty. – p. 6-15.
- 24 Turovskiy I.M. (2008) *Osadki stochnykh vod. Obezvrezhivanie i obezzarazhivanie* [Sewage sludge. Dehydration and decontamination]. – М.: DeLi print. P.376.
- 25 Voronov Yu.V. (2004) *Vodootvedenie i ochestka stochnykh vod* [Wastewater and wastewater treatment]. Moscow. – 702 p.

МАЗМҰНЫ – СОДЕРЖАНИЕ

1-бөлім Раздел 1 Ботаника Ботаника

Дүйсенова Н.И., Темирбаева К.Ж., Белозеров И.Ф., Иманбаева А.А.

Разработка комплексной шкалы диагностики перспективности сортов *Tulipa L.* в Мангышлакском экспериментальном ботаническом саду 4

Рахимова Е.В., Ермекова Б.Д., Кызметова Л.А., Асылбек А.М., Сыпабеккызы Г.

Малоизвестные виды ржавчинных грибов Заилийского Алатау: биология, местонахождение и круг хозяев 17

2-бөлім Раздел 2 Өсімдіктер физиологиясы мен биохимиясы Физиология и биохимия растений

Zhussupova A.I., Omirbekova N.Zh., Zhangissina S., Zhunusbaeva Zh.K.

Comparative study of *Brachypodium distachyon* and kazakhstan soft wheat varieties resistance to *Puccinia recondite* 30

Рамазанова А.А., Ерназарова Г.И., Турашева С.К.

Eichhornia crassipes су өсімдігінің жапырақ және тамырындағы биологиялық белсенді заттар 45

3-бөлім Раздел 3 Биотехнология Биотехнология

Олжаев Ф.С., Сафарова (Янцен) Ю.И., Цой А.К., Умбаев Б.А., Аскарова Ш.Н.

Исследование влияния **остеофильного бисфосфонатного** полимера на пролиферацию, остеогенную дифференцировку адипозных мезенхимальных стволовых клеток и изучение его способности ингибировать активность остеокластов *in vitro*..... 58

4-бөлім Раздел 2 Микробиология Микробиология

Аскарова Ш.Н., Кушугулова А.Р., Кайырлыкызы А., Цой А.К., Масуд А., Олжаев Ф.С.

Кишечный микробиом и болезнь Альцгеймера..... 74

Кайырманова Г. К., Ерназарова А. К., Тапешова Ш. Ж., Дарменкулова Ж. Б., Магмияев Р. Б., Жубанова А. А.

Биоразнообразие термофильной микрофлоры нефтепластовых вод месторождения «Акинген»..... 86

Сапарбекова А.А., Муталиева Б.Ж., Джакашева М.А., Латиф А.С.

Извлечение ресвератрола ферментным препаратом пектинол F-rkm 0719, продуцируемый штаммом *Aspergillus awamori* F-RKM 0719..... 96

Текебаева Ж.Б., Абжалелов А.Б.

Аккумулярующие свойства микроводорослей *Chlorella vulgaris* И 2 и *Parachlorella kessleri* У 1 по отношению к поллютантам различного происхождения 107

Хасенова Э.Ж., Аюпова А.Ж., Сембаева Д.Ж., Сарсенова А.С., Молдагулова Н.Б., Дуамбеков М.С.

Скрининг активных штаммов микроорганизмов для компостирования илового осадка сточных вод..... 116

CONTENTS

Section 1 Botany

- Duisenova N.I., Temirbaeva K.J., Belozarov I.F., Imanbaeva A.A.*
Development of complex scale of diagnostics of perspectivity of Tulipa L. varieties in a Mangyshlak experimental botanical garden 4
- Rakhimova E.V., Ermekova B.D., Kyzmetova L.A., Assylbek A.M., Sypabekkyzy G.*
Little-known species of rust fungi in Trans-ili Alatau: biology, location and host plants range 17

Section 5 Plants Physiology and Biochemistry

- Zhussupova A.I., Omirbekova N.Zh., Zhangissina S., Zhunusbaeva Zh.K.*
Comparative study of *Brachypodium distachyon* and kazakhstan soft wheat varieties resistance to *Puccinia recondite* 30
- Ramazanova A.A., Yernazarova G.I., Turasheva S.K.*
Biological active substances in the leaves and root of the aquatic plant *Eichhornia crassipes* 45

Section 5 Biotechnology

- Olzhaev F.S., Safarova (Jancen) Ju.I., Tsoy A.K., Umbaev B.A., Askarova Sh.N.*
Cell therapy approach for correction of osteoporosis-associated fractures using adipose-derived mesenchymal stem cells functionalized with osteophilic polymer 58

Section 4 Microbiology

- Askarova Sh.N., Kushugulova A.R., Kaiyrylkyzy A., Tsoy A.K., Masoud A., Olzhayev F.S.*
Intestinal Microbiome and Alzheimer's Disease 74
- Kaiyrmanova G.K., Yernazarova A.K., Tapeshova Sh.Zh., Darmenkulova Zh.B., Magmiyev R.B., Zhubanova A.A.*
Biodiversity of thermophilic microflora of oil-bearing waters of the Akingen field 86
- Saparbekova A.A., Mutaliyeva B.Zh., Dzhakasheva M.A., Latif A.S.*
Extraction of resveratrol with the enzyme preparation Pectinol F-RKM 0719 produced by the strain *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 96
- Tekebaeva Zh.B., Abzhalelov A.B.*
The accumulating properties of the microalgae *Chlorella vulgaris* И2 and *Parachlorella kessleri* У 1 in relation to pollutants of different origin 107
- Khasenova E.Zh., Ayupova A.Zh., Sembaeva D.Zh., Sarsenova A.S., Moldagulova N.B., Duambekov M.S.*
Screening of active strains of microorganisms for composting sewage sludge 116