

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

№2 (83)

Алматы
«Қазақ университеті»
2020



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

ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №2 (83) маусым



04. 05. 2017 ж. Қазақстан Республикасының Ақпарат және коммуникация министрлігінде тіркелген

Куәлік № 16494-Ж

Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады
(наурыз, маусым, қыркүйек, желтоқсан)

ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

Сапарғалиева Н.С., б.ғ.к., аға оқытушы (Қазақстан)
e-mail: bb.kaznu.kz@gmail.com

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)

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

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

Нургазин 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

Смекинов И.Т., PhD (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.



Министерство образования и науки
Республики Казахстан
Официальный интернет-ресурс
Комитета по контролю в сфере
образования и науки



Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы

Гүлмира Шаққозова

Телефон: +7 747 125 6790

E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

Редакторлары:

Гүлмира Бекбердиева

Агила Хасанқызы

Компьютерде беттеген

Айгүл Алдашева

ИБ № 13649

Пішімі 60x84 ¹/₈. Көлемі 11,6 б.т. Тапсырыс № 4566.

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, 2020

1-бөлім
БОТАНИКА

Section 1
BOTANY

Раздел 1
БОТАНИКА

Б.Ш. Қалиев^{1,2}, Г.Т. Ситпаева², Қ. Үсен², Б.Р. Сайкенов¹

¹Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²РМК «Ботаника және фитоинтродукция институты» ҚР ЭГТРМ ОШЖДҚ,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: bedelkaliyev@gmail.com

**ЖЕТІСУ АЛАТАУЫ СОЛТҮСТІК МАКРОБЕТКЕЙІНІҢ
АЛАСА ЖӘНЕ ОРТАШАТАУЛАРЫНДАҒЫ
ӨСІМДІКЖАБЫН ТИПТЕРІ**

Мақалада 2018 жылдың тамыз айында Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейіндегі аласа және орташатаулардың («Жоңғар Алатауы» МҰТП аумағынан тыс) өсімдікжабынын зерттеу бойынша жүргізілген жұмыстардың нәтижелері берілген. Бұл аймақтың өсімдік қауымдастықтары өсімдікжабынның далалық типіне жатады. Солтүстік макробеткейдегі дала белдеуі теңіз деңгейінен 800 м-ден 1400 м биіктік диапазондары арасында таралған. Дала белдеуі 3 белдеушеден: шөлденген далалар, нағыз және шалғынды далалардан тұрады. Солтүстік макробеткейдің батыс және орталық бөліктеріндегі еңіс жазықтар бойында шөлденген далалар кездеседі. Ал тауаралық еңіс жазықтардың ылғалдығы салыстырмалы түрде жоғары оңтүстік, кейде батыс беткейлері бойлай нағыз және шалғынды далалар таралған. Мақалада берілген әр белдеушенің негізгі өсімдік типтеріне фитоценоздық сипаттама берілді.

Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейінің далалар белдеуі малазықтық және дәрілік өсімдіктеріне бай, олардың негізгі кескінін далалық астықтұқымдастар (*Festuca valesiaca*, *Helictotrichon desertorum*, *Stipa capillata*, *S. pennata*, *Koeleria cristata*, *Phleum phleoides* және т.б.) қалыптастырады. Өсімдік қауымдастықтарының түрлік құрамында бұталар (*Spiraea hypericifolia*, *Cotoneaster melanocarpus*, *Rosa beggeriana* және т.б.) мен жартылай бұташықтар (*Artemisia sublessingiana*) жиі кездеседі. Алуаншөптер құрамы *Salvia dumetorum*, *Achillea millefolium*, *Tanacetum vulgare*, *Galium verum*, *Thymus marschallianus* және т.б. өсімдіктерден тұрады.

Түйін сөздер: Жетісу Алатауы, солтүстік макробеткей, далалар, өсімдік қауымдастығы, фитоценоздық сипаттама.

B.Sh. Kaliyev^{1,2}, G.T. Sitpayeva², K. Ussen², B.R. Saikenov¹

¹Kazakh National Agrarian University, Kazakhstan, Almaty

²RSE «Institute of botany and phytointroduction» CFW MEGNR RK,
Kazakhstan, Almaty, e-mail: bedelkaliyev@gmail.com

**The vegetation types of low mountains and mid mountains
of Northern range (macro slope) of the Zhetysu Alatau**

The article describes the results of vegetation studies of low mountains and mid mountains of northern range (macro slope) of The Zhetysu Alatau (outside the SNNP «Zhongar Alatau»), which conducted in May 2018. The plant communities of this region belong to the steppe type of vegetation. The steppes on the northern macro slope are distributed in the altitude range from 800 to 1400 m above sea level. Three sub-belts are noted in the steppe zone: desert steppes, true steppes and meadow steppes. Desert steppes are widespread on the ridge low-mountains of the western and central parts of the northern macroslope. The belts of true and meadow steppes are distributed by the intermountain plain, more moisture parts of the southern, sometimes western slopes. Phytocoenotic characteristics of main types of vegetation are done for each altitudinal sub-belt.

The steppes are rich in forage plants with the participation of medicinal plants, dominated by steppe grasses and forbs (*Festuca valesiaca*, *Helictotrichon desertorum*, *Stipa capillata*, *S. pennata*, *Koeleria cristata*, *Phleum phleoides*). Shrubs are often found in communities (*Spiraea hypericifolia*, *Cotoneaster melanocarpus*, *Rosa beggeriana*, *Artemisia sublessingiana* and etc.) In the composition of forbs marked: *Salvia dumetorum*, *Achillea millefolium*, *Tanacetum vulgare*, *Galium verum*, *Thymus marschallianus* and etc.).

Key words: Zhetysu Alatau mountain, northern macroslope, steppes, plant communities, phytocoenotic characteristics.

Б.Ш. Қалиев^{1,2}, Г.Т. Ситпаева², К. Усен², Б.Р. Сайкенов¹

¹Казахский национальный аграрный университет, Казахстан, г. Алматы

²РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭГПР РК,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: bedelkaliyev@gmail.com

Типы растительности низко- и среднегорий северного макросклона Жетысуского Алатау

В статье представлены результаты исследования растительности низко- и среднегорий северного макросклона Жетысуского Алатау (за пределами ГНПП «Жонгар Алатауский»), проведенного в августе 2018 года. Растительные сообщества данного региона относятся к степному типу растительности. Степи на северном макросклоне распределены в высотном диапазоне от 800 до 1400 м над уровнем моря. В степном поясе отмечены три подпояса: опустыненных, настоящих и луговых степей. Опустыненные степи распространены по увалистым низкогорьям западной и центральной частей северного макросклона. Пояса настоящих и луговых степей представлены по межгорным наклонным равнинам, более увлажненных частях южных, иногда западных склонов. В статье приводится фитоценотическая характеристика основных типов растительности каждого высотного подпояса.

Степи богаты кормовыми растениями с участием лекарственных, господствуют степные злаки (*Festuca valesiaca*, *Helictotrichon desertorum*, *Stipa capillata*, *S. pennata*, *Koeleria cristata*, *Phleum phleoides*). Нередко в сообществах встречаются кустарники (*Spiraea hypericifolia*, *Cotoneaster melanocarpus*, *Rosa beggeriana* и др.) и полукустарнички (*Artemisia sublessingiana*). В составе разнотравья отмечены: *Salvia dumetorum*, *Achillea millefolium*, *Tanacetum vulgare*, *Galium verum*, *Thymus marschallianus* и др.

Ключевые слова: Жетысуский Алатау, северный макросклон, степи, растительные сообщества, фитоценотическая характеристика.

Кіріспе

Жетісу Алатауы еліміз аумағында 77,5-82,5⁰ ш.б. пен 44-46,5⁰ с.е. аралығында орналасқан (Юдичев, 1940) [1], негізінен Көксу мен Боротала өзендері екі тау жүйесіне бөліп жатқан әрі параллель орналасқан солтүстік және оңтүстік макробеткейлерден тұрады.

Геоботаникалық аудандастыру принциптеріне сәйкес, Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейі Жоңғар-Солтүстік Тяньшань тау провинциясының Солтүстікжонғар тау провинциясы тармағына жатады [2]. Солтүстік Тяньшань тау жүйесімен көршілес орналасуына қарамастан Жетісу Алатауының бедер құрылымы мен өсімдік жабынының өзіндік ерекшеліктері бар. Мұны эндемизмнің жоғарылығымен байланыстыруға болады.

XX ғасырдың орта тұстарында аймақтағы өсімдік типтерінің жалпы сипатын, олардың экологиялық жағдайын зерттеу бойынша біршама жұмыстар (Н.И. Рубцов, 1937-1948 жж.; В.П.Голоскоков, 1948-1971 жж.) жүргізілді [1,3].

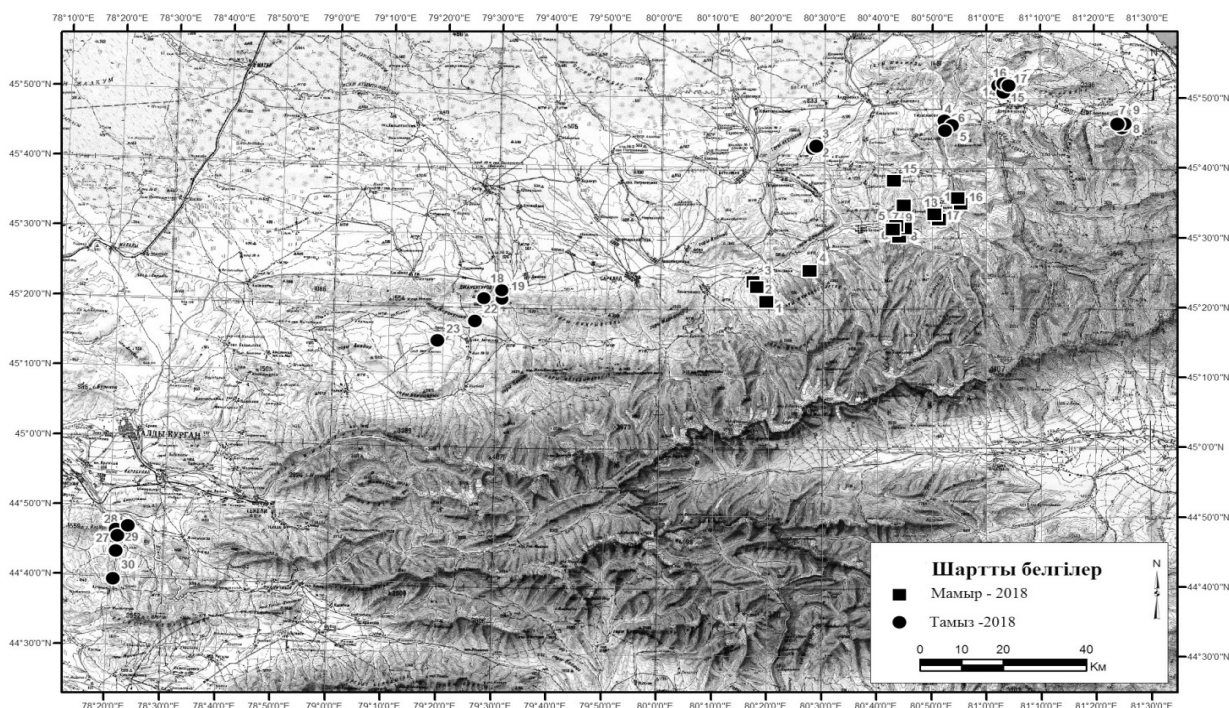
Соңғы жылдары біраз өзгерістер болды – егемендікке қол жеткізген соң бұрынғы тұтас жүйе жойылып, кеңшарлар тарқайды, жер жеке меншікке берілді, алғашында мал саны күрт кемігенімен, кейінгі оншақта жыл барысында мал саны көбейе бастады. Оның үстіне Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейінде жабайы

Сиверс алмасының табиғи популяциясын сақтап қалу мақсатында 2010 жылы «Жоңғар-Алатау» ұлттық табиғи саябағы құрылды. Оның құрамына бұрынғы орман шаруашылықтарының жерімен қоса, шекаралас жатқан жерлер де енгізілді. Яғни, шаруашылық жүргізу жүйесі де, тау экожүйелеріне түсетін жүктеме де өзгерді. Осы себептерге байланысты Ұлттық парктан тыс аумақтардағы өсімдік қауымдастықтарының қазіргі күйін, олардың кеңістікте таралу заңдылықтарын зерттеудің маңыздылығы да жоғарылайды.

Зерттеу нысаны және зерттеу әдістері

Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейі солтүстік-шығысында Алакөлден басталады да, оңтүстік-батысындағы Шолақ тауларына дейінгі аралықты қамтиды. Шартты түрде солтүстік макробеткей деп аталғанымен тау тізбегінің солтүстік бөлігінің өзінде тау беткейлерінің сан алуан экспозицияларындағы өсімдік жамылғысы белгілі бір заңдылықтармен таралады [4, 5].

Жетісу Алатауы солтүстік макробеткейінің солтүстік, солтүстік-шығыс және батыс сілемдерінде жүргізілген экспедиция маршруты Жаманты, Теректі, Қарғалы, Үшбұлақ алқаптарын, Тоқжайлау, Жүнжүрек, Алабас тауларын және Жетісу Алатауының батыс сілемдері – Қапал-Арасан мен Ақтекшенің тауаралық аңғарларын қамтыды (1-сурет).



1-сурет – Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейіндегі зерттеу нүктелері

Өсімдікжабынның кеңістік таралуын зерттеу, фитоценоздық маңыздылығына баға беру жұмыстары негізгі өсімдік қауымдастықтарын геоботаникалық сипаттау және ландшафттық-экологиялық профилдеу әдістері негізінде жүргізілді [6, 7, 8, 9, 10].

Зерттеу нүктелерінің географиялық координаттары, теңіз деңгейінен абсолют биіктігі GPS-пен анықталып, өсімдікжабынның жетекші ассоциацияларының геоботаникалық сипаттамасы жасалды. Геоботаникалық сипаттама беру барысында ландшафттың негізгі компоненттері (жер бедері, топырағы, өсімдігі), ылғалдану жағдайы (атмосфералық, жер үсті мен жер асты сулары және т.б.), өсімдік қалдықтары төсенішінің үлесі (қалыңдығы, компоненттері (кепкен жапырақтар, қабықтар, бұтақтар т.б.)), өсімдік қауымдастығының флоралық құрамы, әр түрдің фенологиялық дамуы, түр қанықтығы (Друде шкаласы), таралуы (Б.А.Быков шкаласы), морфометрлік параметрлері (биіктігі, габитусы), тіршілік формалары (ағаш тектес, шөптесін, бұта т.б.) анықталды [11, 12].

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

Солтүстік макробеткейдегі дала белдеуі теңіз деңгейінен 800 м-ден 1400 м биіктік

диапазондары арасында таралған. Дала белдеуі 3 белдеушеден тұрады: шөлденген – 800-1000 м аралығында, нағыз дала белдеуі – 1000-1200 м аралығында және шалғынды дала белдеушесі – 1200-1400 м аралығында таралған. [2].

Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейінің дала белдеуі ксерофиттік шымды-астықтұқымдастар (*Stipa capillata* L., *Stipa lessingiana* Trin. & Rupr., *Festuca valesiaca* Schleich. ex Gaudin) мен жартылай бұташық – майқара жусан (*Artemisia sublessingiana* Krasch. ex Poljakov) басым келетін шөлденген далалардан бастау алады.

Солтүстік макробеткейдің батыс бөлігіндегі Ақтекше, Байтурбау алқаптарының теңіз деңгейінен 700-900 м биіктік диапазонында негізінен майқаражусанды-шымдыастықтұқымдасты (*Stipa capillata*, *Festuca valesiaca*, *Artemisia sublessiangiana*) шөлденген далалар кең таралған. Қауымдастықтардың түрлік құрамында жуашықты қоңырбас (*Poa bulbosa* L.), дала шалфейі (*Salvia dumetorum* Andr. ex Besser), кәдімгі мыңжапырақ (*Achillea millefolium* L.), иісті киікоты (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) жиі кездеседі [13]. Ақтекше алқабының (901 м т.д.) ылғалдылығы салыстырмалы түрде көбірек [14] түсетін солтүстік-батыс беткейінің еңіс жерлерінде бұталар аралас алуаншөпті-

астықтұқымдастар қауымдастықтары қалың өсімдік жамылғысын қалыптастырады. Ценоздың түрлік құрамында шалғын қоңырбасы (*Poa pratensis* L.), кәдімгі тарғақшөп (*Dactylis glomerata* L.), кәдімгі жұпаргүл (*Origanum vulgare* L.), кәдімгі жоңышқа (*Medicago sativa* L.), тікенжеміс кәрікыз (*Lappula spinocarpus* (Forssk.) Asch. ex Kuntze), дала шалфейі (*Salvia dumetorum*), беггер раушаны (*Rosa beggeriana* Schrenk ex Fisch. & C.A.Mey.), альберт раушаны (*Rosa albertii* Regel), шайқурай тобылғы (*Spiraea hypericifolia* L.) және татар үшқаты (*Lonicera tatarica* L.) көбірек кездеседі [15, 16]. Ақтекше алқабынан солтүстік бағытқа қарай Байтурбау

жотасына (896 м т.д.) дейінгі тауаралық аңғарлар мен ойыстар майқаражусанды-шымдыастықтұқымдастар (2а-сурет) мен бұталар аралас арамшөпті-астықтұқымдастар қауымдастықтарынан (2ә-сурет) тұрады (кесте 1). Алуаншөптердің – кәдімгі түймешетен (*Tanacetum vulgare* L.), нағыз қызылбояу (*Galium verum* L.), маршалл жебірі (*Thymus marschallianus* Willd.), иісті киікоты (*Ziziphora clinopodioides*), кәдімгі ақмия (*Sophora alopecuroides* L.), тікенді шағыртікен (*Onopordum acanthium* L.) және т.б. үлесі бұл далаларда аздау келеді. Проективтік жабын 60-80%-дан аспайды. Өсімдікжабын аздап деградияцияға ұшыраған.



а – майқаражусанды-шымдыастықтұқымдастар қауымдастығы



ә – бұталар аралас арамшөпті-астықтұқымдастар қауымдастығы

2-сурет – Ақтекше және Байтурбау алқаптарының шөлденген далалары

Байтурбау жотасының (777 м) солтүстік-шығыс беткейіне қарай өсімдікжабынның түрлік құрамында дәрілік – мадияр көкжалбызы (*Nepeta nuda* L.), түймешетен (*Tanacetum vulgare*), таулық фломис (*Phlomis oreophila* (Kar. & Kir.) Adylov, Kamelin & Makhm.), шалфей (*Salvia dumetorum*), мыңжапырақ (*Achillea millefolium*), киікоты (*Ziziphora clinopodioides*), бал беруші – қызылбояу (*Galium verum*), маршалл жебірі (*Thymus marschallianus* Willd.), малазықтық – қылтаң селеу (*Stipa capillata*), кәдімгі бетеге (*Festuca valesiaca*), қоңырбас (*Poa bulbosa*), жоңышқа (*Medicago sativa*) және т.б. түрлер жиі кездеседі [17].

Қапал алқабының маңындағы тауаралық жазықтар мен аласатаулы аумақтардың (1125-1260 м т.д.) аз дамыған күңгірт-күрен топырақтарында майқаражусанды-эфемерлі-шымдыастықтұқымдастар мен қоңырбасты-

қаулы-жусан қауымдастықтары жақсы дамыған [18]. Фитоценоздардың басты доминанттары: *Stipa capillata*, *Festuca valesiaca*, *Poa bulbosa*, *Artemisia sublessiangularia*. Шөпқұрамда: ұсақ-жемісті сасыр (*Ferula ovina* (Boiss.) Boiss.), шалфей (*Salvia dumetorum*), орыс гүлкекіресі (*Centaurea ruthenica* Lam.), мыңжапырақ (*Achillea millefolium*), қызылбояу (*Galium verum*) үлесі аздау келеді. Негізгі эдификатор қызметін *Artemisia sublessiangularia* атқарады. Шөпқұрам сирек, проективтік жабын 40-45%-дан кем. Қапал (1051 м) тауына жақындаған сайын қауымдастықтар құрамында таулы-азиялық элемент – қиякөлендер (*Carex humilis* Leyss., *Carex turkestanica* Regel) мен шөлдік элемент – изендер (*Bassia prostrata* (L.) Beck.) кездесе бастайды. Суықсай (1041 м) алқабының солтүстік-шығыс беткейлерінде жиі таралған қиякөлең аралас майқаражусанды-шымдыастықтұқымдастар

қауымдастықтарын қияқөлең аралас алуаншөпті-қаулы-бұта қауымдастықтары ауыстырады. Өсімдікжабын құрамын тобылығы (*Spiraea hypericifolia*), беггер раушаны (*Rosa beggeriana*), селеу (*Stipa capillata*), кішкене қияқөлең (*Carex humilis*), бемеге (*Festuca valesiaca*), қоңырбас келлерия (*Koeleria macrantha* (Ledeb.) Schult.), шілтер жапырақ шәйқурай (*Hypericum perforatum* L.), құс таран (*Polygonum aviculare* L.), таулық флоμισ (*Phlomis oreophila*), күлгін қазтабан (*Potentilla inclinata* Vill.) және т.б. қалыптастырады. Аласа таулардың еңіс беткейлерінің негізгі өсімдікжабының бұталар аралас гүлкекірелі-майқаражусанды-астықтұқымдастар қауымдастықтары қалыптастырады. Қаулы далалардың жоғарғы шекарасында биіктаулық элементтер: флоμισ (*Phlomis oreophila*), қазтабан (*Potentilla inclinata*) және *Allium*, *Tulipa*, *Astragalus* туыстарының біраз түрлері кездеседі [19, 20].

Шөлденген далалар белдемшесі жоғары қарай ксерофиттік және мезоксерофиттік шымдыастықтұқымдастардан (*Stipa capillata*, *Stipa lessingiana* Trin. & Rupr., *Festuca valesiaca*, *Koeleriapyramidata* (Lam.) P. Beauv., *Helictotrichon desertorum* (Less.) Pilg.) тұратын нағыз далаларға ауысады, түрлік құрамда алуаншөптерден *Salvia*, *Astragalus*, *Alcea* туыстары жиі кездеседі, бұталардан *Rosa*, *Spiraea*, *Cotoneaster*, *Lonicera*, *Atraphaxis* туыстары кең таралған.

Е.И. Рачковскаяның (2003 ж.) экологиягиялық-физиономиялық жіктемесі бойынша нағыз далалар теңіз деңгейінен 1000-1200 м биіктік диапазонында таралғанымен [2], тауалды және аласатаулы белдеудің жазықтарында да

жиі кездеседі. Саздақты кәдімгі қара топырақ таралған солтүстік макробеткейдің солтүстік-шығыс сілемдерінің (Шыбынды алқабы, 1071 м, проективтік жабын 90-95%) өсімдікжабын формациясын *Stipa capillata*, *Festuca valesiaca* басымдылығы айқын байқалатын алуаншөпті-шымдыастықтұқымдастар қауымдастықтары (3а-сурет) құрайды. Ал саздақты күңгірт күрең топырақты аймақтардағы фиоценоздардың түрлік құрамында алуаншөптерден далалық шырмауық (*Convolvulus arvensis* L.), күлгін қазтабан (*Potentilla inclinata*), мадияр көкжалбызы (*Nepeta nuda*), жасыл бүлдірген (*Fragaria viridis* Weston), кәдімгі түймешетен (*Tanacetum vulgare*), орыс гүлкекіресі (*Centaurea ruthenica*), нағыз қызылбояу (*Galium verum*), таулық флоμισ (*Phlomis oreophila*), түлкі астрагалы (*Astragalus vulpinus* Willd.); астықтұқымдастардан тянь-шань қияғы (*Leymus tianschanicus* (Drobow) Tzvelev), жуашықты қоңырбас (*Poa bulbosa*); арамшөптерден жабайы асүттіген (*Lactuca serriola* L.) көбірек кездеседі. Кейде бұл далаларда шашыраңқы түрде таралған бұталар аралас майқаражусанды-шымды-астықтұқымдастар ассоциациялары (3ә-сурет) кездеседі. Қауымдастықтар құрамында *Stipa capillata*, *Festuca valesiaca* басым келеді. Бұл үдеріс әсіресе Жаманты алқабының (981 м) маңындағы тауаралық еңіс жазықтарда көбірек байқалады. Ценоз құрамында шайшөп (*Hypericum perforatum*), қазтабан (*Potentilla inclinata*), қызылбояу (*Galium verum*), ерте қияқөлең (*Carex praecox* Schreb.) және жуашықты қоңырбастың (*Poa bulbosa*) үлесі біршама [21], проективтік жабын 75-80%-ды құрайды (1-кесте).



а – нағыз алуаншөпті-шымдыастықтұқымдасты далалар



ә – бұталар аралас нағыз (күрғақ) шымдыастықтұқымдасты далалар

3-сурет – Солтүстік макробеткейдің солтүстік-шығыс сілемдерінің өсімдікжабын формациялары

Биіктік профилі бойынша нағыз далалардан кейінгі кең аймақта шалғынды далалар таралған. Мұнда ксеромезофиттік және мезофиттік шымдыастықтұқымдастардан дала атқонағы (*Phleum phleoides* (L.) H.Karst.), дала қоңырбасы (*Poa versicolor* Besser), шелл сұлыбасы (*Helictotrichon schellianum* (Hack.) Kitag.) мен қылтаң боз қауы (*Stipa pennata* L.), сондай-ақ қияқөлең (*Carex humilis*) түрлері басым, алуаншөптер де бітік келеді. Әдетте, олармен араласа жер бедерінің ойыстары мен жоталары арасындағы сайларда бұталар нуы кездеседі [22].

Солтүстік макробеткейдің солтүстік-шығыс сілемдерінің басым бөлігін «Солтүстіктянь-шаньдық» деп аталатын таудың шалғынды далалары мен далаланған шалғындар алып жатыр (Рубцов, 1948) [3]. Шөпқұрамдағы түрлі экологиялық топтардың басымдылығына байланысты оларды не шалғынды далаларға, не далаланған шалғындарға жатқызуға болады. Шалғынды далалар солтүстік және оңтүстік беткейлерге де тән [23].

Бұл өңірдегі орташатаулы аймақтардың басым аумағын алуаншөпті-астықтұқымдастар және бұталар аралас алуаншөпті-астықтұқымдастар далалары алып жатыр. Қауымдастықтардың шөпқұрам негізін ксеромезофиттік түрлер: кәдімгі тарғақшөп (*Dactylis glomerata*), орман қоңырбасы (*Poa nemoralis* L.), шалғын түлкікүйрығы (*Alopecurus pratensis* L.), дала шалфейі (*Salvia dumetorum*), қышабас (*Barbarea plantaginea* DC.), дон эспарцеті (*Onobrychis arenaria* (Kit.) DC.) қалыптастырады. Одан басқа көптеген малазықтық – жоңышқа (*Medicago sativa*), шырмауық (*Convolvulus arvensis*), тяньшань қияғы (*Leymus tianschanicus*), шалғын чинасы (*Lathyrus pratensis* L.), жуашықты қоңырбас

(*Poa bulbosa*), түлкі астрагалы (*Astragalus vulpinus*); дәрілік – мыңжапырақ (*Achillea millefolium*), қазтабан (*Potentilla inclinata*), көкжалбыз (*Nepeta nuda*), шәйқурай (*Hypericum perforatum*), түймешетен (*Tanacetum vulgare*), киікоты (*Ziziphora clinopodioides*), фломис (*Phlomis oreophila*), сасыр (*Ferula ovina*); бал беруші – дөңшіл қазтамақ (*Geranium collinum* Stephan ex Willd.), нағыз қызылбояу (*Galium verum*), маршалл жебірі (*Thymus marschallianus* Willd.); тағамдық – татар үшқаты (*Lonicera tatarica*), қожақат таңқурай (*Rubus caesius* L.); сәндік – шайқурай тобылғы (*Spiraea hypericifolia*) түрлері кең таралған (4а-сурет).

Бұталар аралас алуаншөпті-қаттысабақты астықтұқымдастар шалғынды далалары көбіне жоталардың батыс, оңтүстік және солтүстік экспозицияларының (Шыбынды жотасы, 1085 м т.д.) төменгі бөліктерінде жақсы дамыған. Шөпқұрам биік, әрі қалың. Проекттік жабын 95-100%. Шөптесіндер жікқабатында астықтұқымдастардан жіңішке қияқ (*Leymus angustus* (Trin.) Pilg.), тарғақшөп (*Dactylis glomerata*), қоңырбас түрлері (*Poa nemoralis*, *P. pratense*) басым, алуаншөптерден дала шалфейі (*Salvia dumetorum*), кәдімгі қышабас (*Barbarea vulgaris* R.Br.), кавказ көкшегүлі (*Polemonium caucasicum* N. Busch), кәдімгі жоңышқа (*Medicago sativa*), шалғын чинасы (*Lathyrus pratensis*), ат құлақ қымыздық (*Rumex confertus* Willd.), жирен майда-желек (*Erigeron aurantiacus* Regel), тікенді скалигерия (*Scaligeria setacea* (Schrenk ex Fisch. & C.A. Mey.) Korovin) жиі кездеседі (4ә-сурет). Биіктік артқан сайын тобылғы (*Spiraea hypericifolia*), қара жемісті ырғай (*Cotoneaster melanocarpus* Fisch. ex A.Blytt), раушан (*Rosa beggeriana*, *R. albertii*) мен үшқат түрлерінен (*Lonicera tatarica*, *L. microphylla*) тұратын бұталар нуы жиілейді.

1-кесте – Солтүстік макробеткейдің аласа және орташа тауларында кездесетін экономикалық маңызды өсімдік түрлері

Түрлер атауы	Түр молдығы / биіктік		
	896 м, Байтурбау жотасының еніс баурайы	981 м, Жаманты алқабы, тауаралық еніс жазық	1476 м, Тоқжайлау жотасы, солтүстік-шығыс беткей
Ағаштар			
	-	-	-
Бұталар			
<i>Spiraea hypericifolia</i>	sol	sol	sol
<i>Rosa laxa</i>	-	sol	-
<i>Rosa spinosissima</i>	sol	sol	-
<i>Rosa beggeriana</i>	-	-	sol

Түрлер атауы	Түр молдығы / биіктік		
	896 м, Байтурбай жотасының еңіс баурайы	981 м, Жаманты алқабы, тауаралық еңіс жазық	1476 м, Тоқжайлау жотасы, солтүстік-шығыс беткей
<i>Rosa albertii</i>	-	-	sol
<i>Lonicera tatarica</i>	-	-	sol
Жартылай бұташықтар			
<i>Artemisia sublessiangularia</i>	sol	sp	-
<i>Artemisia absinthium</i>	-	-	sol
Шөптер			
<i>Stipa capillata</i>	sp	sp	-
<i>Festuca valesiaca</i>	sol	sp	-
<i>Bothriochloa ischaemum</i>	-	-	cop2
<i>Dactylis glomerata</i>	-	-	cop2
<i>Carex praecox</i>	-	sol	-
<i>Poa pratensis</i>	-	-	cop1
<i>Poa bulbosa</i>	sol	sol	-
<i>Hypericum perforatum</i>	-	sol	cop1
<i>Origanum vulgare</i>	-	-	cop1
<i>Onopordum acanthium</i>	cop1	-	-
<i>Achillea millefolium</i>	sol	-	sp
<i>Sophora alopecuroides</i>	cop1	-	-
<i>Echinops ruthenicus</i>	sp	-	-
<i>Polygonum aviculare</i>	-	-	sp
<i>Centaurea ruthenica</i>	-	sol	-
<i>Agropyron repens</i>	-	-	sol
<i>Phleum phleoides</i>	-	-	sol
<i>Barbarea vulgaris</i>	-	-	sol
<i>Salvia dumetorum</i>	sol	-	sol
<i>Verbascum phoeniceum</i>	-	-	sol
<i>Bromus inermis</i>	-	-	cop1
<i>Medicago sativa</i>	-	-	sol
<i>Potentilla inclinata</i>	-	sol	sol
<i>Lathyrus pratensis</i>	-	-	sol
<i>Nepeta pannonica</i>	-	-	sol
<i>Polemonium caucasicum</i>	-	-	sol
<i>Rumex confertus</i>	-	-	sol
<i>Erigeron aurantiacus</i>	-	-	sol
<i>Tanacetum vulgare</i>	sol	-	sol
<i>Galium verum</i>	-	-	sol
<i>Geranium collinum</i>	-	-	sol
<i>Allium karolkovii</i>	-	sol	-

*cop1 – біршама молдау; *cop2 – мол; *sp – жиі, бірақ мол емес; *sol – сирек



а – ксеромезофиттік алуаншөпті-астықтұқымдасты шалғынды далалар



ә – бұталар аралас алуаншөпті-қаттысабақты астықтұқымдасты далалар

4-сурет – Орташа таулардағы өсімдікжабын типтері

Токжайлау жотасының солтүстік-батыс беткейінде (1367 м т.д.) жақсы дамыған бұталар аралас астықтұқымдасты-алуаншөп қауымдастықтары солтүстік-шығыс беткейлерге (1467 м т.д.) қарай алуаншөпті-астықтұқымдастар қауымдастықтарына ауысады (кесте 1). Мұндай фитоценоздардың негізін астықтұқымдастардан қантияр бозшағыл (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng), тарғақшөп (*Dactylis glomerata*), қоңырбас түрлері (*Poa nemoralis*, *P. pratensis*), қылтаңақсыз арпабас (*Bromus inermis* Leyss), ал алуаншөптерден шайшөп (*Hypericum perforatum*), жұпаргүл (*Origanum vulgare*), мыңжапырақ (*Achillea millefolium*), құс таран (*Polygonum aviculare*) қалыптастырады. Сондай-ақ тобылғы (*Spiraea hypericifolia*) мен раушан түрлерінен (*Rosa beggeriana*, *R. albertii*) тұратын жекелеген бұталар да кездеседі (1-кесте).

Бұл өңірдегі далаланған шалғындар шөпкұрамдағы шалғынды ксеромезофиттік элементтердің (*Dactylis glomerata*, *Bromus inermis*, *Brachypodium pinnatum* (L.) P.Beauv. (салалы шебершөп), *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth (құрғақ айрауық) айқын басымдылығымен сипатталады [23]. Орташа таулардағы далаланған шалғындар жазықтау жерлерде, бұталар нуы таралған сай-салаларда тауаралық аңғарлардағы алуаншөпті шалғындармен араласа орналасқан [24]. Шөпкұрам биіктеу келеді, проективтік жабын әдетте 90-95% айналасында. Астықтұқымдастардан қантияр бозшағыл мен кәдімгі тарғақшөп басым келеді, алуаншөптерден құс таран (*Polygonum aviculare*), шайшөп (*Hypericum perforatum*), жұпаргүл (*Origanum vulgare*), мыңжапырақ (*Achillea millefolium*), күлгін аюқұлақ

(*Verbascum phoeniceum* L.), кавказ көкшегүлі (*Polemonium caucasicum*), жирен майдажелек (*Erigeron aurantiacus*), ат құлақ қымыздық (*Rumex confertus*) және т.б. тіркелді. Бұталардан шалғынды далалардағы секілді *Rosa*, *Cotoneaster*, *Berberis*, *Lonicera* туыстары жиі кездеседі. Өзен аңғарлары (Тентек өзенінің орта ағысы, 820 м т.д.) бойлай жабайы жемісті және жидекті өсімдіктер: тобылғы (*Spiraea hypericifolia*), үшқат (*Lonicera stenantha* Pojark., *L. tatarica*), таңқурай (*Rubus caesius*, *Rubus idaeus* L.), раушан (*Rosa laxa* Retz., *Rosa platyacantha* Schrenk, *Rosa acicularis* Lindl., *Rosa spinosissima* L.), шетен (*Sorbus tianschanica* Rupr.) жоғары алуандығымен көзге түседі. Өзен аңғарларын бойлай кездесетін галереялы ормандар терек (*Populus laurifolia* Ledeb., *Populus talassica* Kom.), қайың (*Betula pendula* Roth, *Betula tianschanica* Rupr.), сондай-ақ тал (*Salix triandra* L., *Salix pentandra* L.) ағаштары мен бұта (*Salix kirilowiana* Stschegl., *Salix viminalis* L.) түрлерінен тұрады [25]. Шөпкұрамда орман қоңырбасы, дала шалфейі, кәдімгі жұпаргүл, тьянь-шань қияғы, маршалл жебірі, иісті киікоты саны басым. Шалғынды далалар мен далаланған шалғындар мал жайылымы мен шабындық ретінде пайдаланылады.

Қорытынды

2018 жылдың тамыз айында Жетісу Алатауы солтүстік макробеткейінің «Жоңғар Алатауы» Мемлекеттік ұлттық табиғи саябағы аумағынан тыс орналасқан тауалды және аласатаулы (батыс және солтүстік-шығыс сілемдері) аймақтарда жүргізілген далалық-

геоботаникалық экспедиция барысында өңірдің өсімдікжабынының ерекшеліктері зерттелді. Экономикалық маңызды түрлердің мекенорны анықталып, экологиялық топтарға қатыстылығы анықталды.

Жетісу Алатауының солтүстік макробеткейінің дала белдеулері малазықтық және дәрілік өсімдіктерге бай, далалық астықтұқымдастар өсімдікжабынның негізін құрайды. Өсімдік қауымдастықтарының түрлік құрамында бұталар, жартылай бұташықтар және алуаншөптер жиі кездеседі. Өзендердің молдығы малазықтық түрлерге бай шалғынды өсімдікжабынның жақсы

өсуіне ықпал етеді. Мұндай жерлер шабындық ретінде жиі пайдаланылады. Өзен аңғарларын бойлай кездесетін галереялы ормандар ағаштар мен бұталар түрлерінен тұрады. Биіктегі өзен террасаларында Сиверс алмасының шоқтары жиі таралған.

Зерттеу жұмыстары «Биологиялық алуандықты сақтаудың тұрақты жүйесі ретінде өсімдіктерді сақтауға арналған ғаламдық стратегияның Қазақстан үшін маңызды ғылыми-практикалық міндеттерін мемлекеттік ботаникалық бақтардың жүзеге асыруы» бағдарламасы аясында жүргізілді.

Әдебиеттер

- 1 Голоскоков В.П. Флора Джунгарского Алатау. – Алма-Ата: Наука, 1984. – 224 с.
- 2 Botanical Geography of Kazakhstan and Central Asia (within the desert area). (2003). Rachkovskaya EI, Volkova EA, Hramtsov VN (eds.) Saint Petersburg, Boston-Specter, 423 pp.
- 3 Рубцов Н.И. Растительный покров Джунгарского Алатау. – АН КазССР, Алма-Ата, 1948. -183 с.
- 4 Камелин Р.В. Флорогенетический анализ естественной флоры горной Средней Азии. Л.: Наука, 1973. 356 с.
- 5 Kùchler A.W. A physiognomic classification of vegetation. – Annals of the American Association of Geographers, 1949. 39: 201-210.
- 6 Полевая геоботаника. – М.-Л.: Наука, 1959-1976, в 5 томах. – Т. 1-5.
- 7 Ellenberg H., Mueller-Dombois D. Tentative physiognomic-ecological classification of plant formations of the Earth. Report SC/WS/269. – UNESCO, Paris. 1967.
- 8 Sparsely vegetated ecosystems outside the NATURA 2000 network in Bulgaria. Condition and services. Vladimir Vladimirov, Ana Petrova. Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences. Sofia, 2017.
- 9 Vladimirov V(ed.). A Pilot Network of Small Protected Sites for Conservation of Rare Plants in Bulgaria. IBER – BAS & MoEW, Sofia 2014.
- 10 Catorci A., Tardella F. M., Piermarteri K., Pennesi R., Malatesta L., Corazza M., Scocco. Effect of red deer grazing on alpine hay meadows: biodiversity and management implications. – Applied Ecology and Environmental Research 14 (2): 2016, 301-318.
- 11 Быков Б.А. Геоботаника. – Алма-Ата: Наука, 1978. – 288 с.
- 12 Petr D. Gunin, Sergey N. Bazha, Inessa M. Miklyayeva, Tatiana Y.Karimova, Igor A.Petukhov, Anatoly V.Andreev, Evgenij A. Bogdanov, Enkhe G. Tsyrempilov. Practice of Geobotanical Indication of Forest Growth Conditions in the Steppe and Wooded Steppe Ecotone in Central Mongolia. Journal of Ecological Engineering. Volume 21, Issue 2, February 2020, pages 10-21.
- 13 С.А. Арыстанғалиев, Е.Р. Рамазанов. Растения Казахстана. Издательство «НАУКА» Казахской ССР, Алма-Ата, 1977. 288 с.
- 14 Справочник по климату Казахстана. Многолетние данные. Раздел 2 Атмосферные осадки. Выпуск 8. Алматинская область. – Алматы: РГП Казгидромет, 2004б. – 71 с.
- 15 Флора Казахстана / Под ред. Н. В. Павлова. – Алма-Ата: Изд-во АН Казахской ССР, 1956. – Т. 1. – 354 с.; 1958. – Т.2. – 292 с.; 1960. – Т. 3. – 460 с.; 1961. – Т. 4. – 548 с.; 1961. – Т. 5. – 515 с.; 1963. – Т. 6. – 465 с.; 1964. – Т. 7. – 497 с.; 1965. – Т.8. – 447 с.; 1966. – Т. 9. – 640 с.
- 16 Dimeyeva L., Vesselova P. Identification of Important Plant Areas in Kazakhstan // Proceedings of 7th PLANTA EUROPA Conference «Plants for people, People for plants». – USA: Horizon Research Publishing, 2015. – P. 52-57.
- 17 Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г., Нелина Н.В., Каржаубекова Ж.Ж. Аннотированный список лекарственных растений Казахстана. – Алматы, 2014 – 200 с.
- 18 Почвы Казахстана: русско-казахский словарь справочник / Р.А. Мирзадинов, С.Л. Дүйсенбеков, Қ. Үсен и др.; Министерство образования и науки РК, Казахская академия транспорта и коммуникации им. М. Тынышпаева. – Алматы: КазАТК, 2008. – 271 с.
- 19 Зеленая книга Республики Казахстан. Перечень уникальных растительных сообществ Казахстана. Отчет о НИР / под ред. академика И.О. Байтулина. – 2007. – 296 с.
- 20 Красная книга Казахстана. Т. 2: Растения. – Астана: Издательство: АртPrint, 2014. – 452 с.
- 21 Комплексные исследования диких сородичей культурных растений Западного Тянь-Шаня. – Г.Т. Ситпаева, П.В.Веселова, Н.Г. Гемеджиева, Л.М. Грудзинская, А.В. Кердяшкин, Г.М. Кудабаева, Г.С. Муканова, Т.Ш. Муртазаева, Е.В.Рахимова, Э.С. Саметова, К. Усен. – Алматы, 2014. – 194 с.
- 22 Димеева Л.А., Исламгулова А.Ф., Аблайханов Е.Т. Фитоценологическая характеристика степной растительности Джунгарского Алатау // Материалы VII-го Международного симпозиума «Степи Северной Евразии». Оренбург: Димур, 2015, с. 307-311.

- 23 И.И. Ролдугин. От Прибалхашья до Джунгарских ворот. – Алматы: LEM, 2015. – С. 140.
- 24 Dimeyeva L., Sitpayeva G., Ussen K., Orlovsky L., Ablaihanov E., Islamgulova A., Zhang Y.M., Zhang J., Suleimenova N. Meadow vegetation of the Zhetysu Alatau Mountains // *Applied ecology and environmental research*. – 2016. – 14 (4). – P. 375-398.
- 25 Димеева Л.А., Султанова Б.М., Усен К., Калиев Б.Ш., Аблайханов Е.Т., Иманалинова А.А. Растительность долин рек Жетысуского Алатау // Труды Семнадцатой международной научно-практической конференции «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии». Барнаул, Артыбаш 24-27 мая 2018 г. С. 54-57.

References

- 1 Arystangaliev S.A., Ramazanov E.R. (1977) *Rasteniya Kazakhstana [Plants of Kazakhstan]*. Izd-vo Nauka Kazakh SSR. Alma-Ata. – 288 p.
- 2 Baitulin I.O. (ed.) (2007): *Zelenaya kniga Kazakhstana. Perechen unikalnykh rastitelnykh soobshestv [Green Book of Kazakhstan]*. – 296 p.
- 3 *Botanical Geography of Kazakhstan and Central Asia (within the desert area)*. (2003). Rachkovskaya EI, Volkova EA, Hramtsov VN (eds.) Saint Petersburg, Boston-Specter, 423 pp.
- 4 Bykov B.A. (1978) *Geobotany [Geobotanika]*. Alma-Ata, Nauka, 288 p.
- 5 Catorci A., Tardella F. M., Piermarteri K., Pennesi R., Malatesta L., Corazza M., Scocco P. (2016): Effect of red deer grazing on alpine hay meadows: biodiversity and management implications. – *Applied Ecology and Environmental Research* 14 (2): 301-318.
- 6 Dimeyeva L., Islamgulova A., Ablaihanov E. (2015): Phytocoenotic characteristics of steppe vegetation in Junggar Alatau mountains. – In: *Proceedings of VII Symposium “Steppes of Northern Eurasia”*. – Dimur, Orenburg. pp. 307-311.
- 7 Dimeyeva L., Vesselova P. (2015) Identification of Important Plant Areas in Kazakhstan. *Proceedings of 7th PLANTA EUROPA Conference «Plants for people, People for plants»*, USA, Horizon Research Publishing, pp. 52-57.
- 8 Dimeyeva L.A, Sultanova B.M., Ussen K., Kaliyev B.Sh., Ablaykhanov E.T., Imanalinova A.A. (2018) Rastitelnost dolin rek Zhetysuskogo Alatau [Vegetation of the river valleys of Zhetysu Alatau]. Barnaul, pp. 54-57.
- 9 Dimeyeva Liliya, Sitpayeva Gulnara, Ussen Kapar, Orlovsky Leah, Ablaihanov Elshat, Islamgulova Anastasia, Zhang YuanMing, Zhang, J., Suleimenova N. (2016) Meadow vegetation of the Zhetysu Alatau Mountains. *Applied ecology and environmental research*, 14 (4), pp. 375-398.
- 10 Ellenberg H., Mueller-Dombois D. (1967): Tentative physiognomic-ecological classification of plant formations of the Earth. Report SC/WS/269. – UNESCO, Paris.
- 11 *Flora Kazakhstana (1956, 1958, 1960, 1961, 1963, 1964, 1965, 1966) [Flora of Kazakhstan]*. Pod red. N. V. Pavlova, Alma-Ata, Izd-vo AN Kazakhskoy SSR, vol. 1., 354 p.; vol. 2. 292 p.; vol. 3, 460 p.; vol. 4, 548 p.; vol. 5, 515 p.; vol. 6, 465 p.; vol. 7, 497 p; vol. 8, 447 p.; vol. 9, 640 p.
- 12 Goloskokov V.P. (1984) *Flora Dzhungarsogo Alatau [Flora Dzhungar Alatau]*, Nauka, Alma-Ata. – 224 p.
- 13 Grudzinskaya L.M., Gemedzhiyeva N.G., Nelina N.V., Karzhaubekova Zh.Zh. (2014) Annotirovanny spisok lekarstvennykh rasteny Kazakhstana [Annotated list of medicinal plants of Kazakhstan]. Almaty, 200 p.
- 14 Gunin P.D., Bazha S.N., Miklyayeva I.M., Karimova T.Y., Petukhov I.A., Andreev A.V., Bogdanov E.A., Tsyrempilov E.G. (2020): Practice of Geobotanical Indication of Forest Growth Conditions in the Steppe and Wooded Steppe Ecotone in Central Mongolia. *Journal of Ecological Engineering*. Volume 21, Issue 2, pp. 10-21.
- 15 Kamelin R.V. (1973) Florogeneticheskiy analiz yestestvennoy flory gornoy Sredney Azii [Florogenetic analysis of natural flora of mountain Central Asia]. Nauka, Leningrad, 356 p.
- 16 *Krasnaya kniga Kazakhstana. [Red Book of Kazakhstan]* (2014), Tom 2: Rasteniya (koll. avt.). Astana. – 452 p.
- 17 Kuchler A.W. (1949). A physiognomic classification of vegetation. – *Annals of the American Association of Geographers*, 39: 201-210.
- 18 Mirzadinov R.A., Duisenbekov S.L., Ussen K., etc. (2008) *Pochvy Kazakhstana: russko-kazakhski slovar spravochnik [Soil of Kazakhstan: guide to russian-kazakh dictionary]*. Almaty, 271 p.
- 19 *Polevaia geobotanika (1959-1976) [Field geobotany]*. M., L., Science. In 5 volumes: 1: 498, 2: 500, 3: 530, 4: 336. 5: 320.
- 20 Roldugin I.I. (2015) *Ot Pribalkhashiya do Dzhungarskikh vorot [From Balkhash to the Dzhungarian gates]*. Almaty: LEM, 140 p.
- 21 Rubtsov N.I. (1948) *Rastitelny pokrov Dzhungarskogo Alatau [Vegetation cover of Dzhungar Alatau]* – AN KazSSR, Alma-Ata. -183 p.
- 22 Sitpayeva G.T. (ed). *Kompleksnoe issledovanie dikikh sorodichey kulturnykh rasteniy Zapadnogo Tiyan-Shanya [Comprehensive research of wild relatives of cultivated plants of the Western Tien Shan mountain]*. Almaty, – 194 p.
- 23 *Spravochnik po klimatu Kazakhstana. Mnogoletniye dannye. Razdel 2 Atmosfernye osadki. Vypusk 8. Almatinskaya oblast (2004b) [Guide to the climate of Kazakhstan. Long-term data. Section 2 Atmospheric precipitation. Issue 8. Almaty region]*. Almaty, RGP Kazgidromet, – 71 p.
- 24 Vladimir Vladimirov, Ana Petrova (2017). Sparsely vegetated ecosystems outside the NATURA 2000 network in Bulgaria. Condition and services. Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences. Sofia.
- 25 Vladimir V. (ed.) (2014): *A Pilot Network of Small Protected Sites for Conservation of Rare Plants in Bulgaria*. IBER – BAS & MoEW, Sofia.

М.С. Рамазанова, Л.М. Грудзинская, Н.Г. Гемеджиева

РГП на ПХВ «Институт ботаники и фитоинтродукции» КЛХЖМ МЭГПР РК,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: r.madin.c@mail.ru

ИНТРОДУКЦИЯ КАЗАХСТАНСКИХ ВИДОВ ИРИСОВ

По разным источникам во флоре Казахстана встречается 19 (22) видов с 3 редкими видами (*Iris alberti* Regel, *I. ludwigii* Maxim, *I. tigridia* Bunge), из которых *I. ludwigii*, *I. alberti* являются эндемичными. В народной медицине применяются 8 видов. Большая часть дикорастущих ирисов произрастает на юго-востоке Казахстана в различных экологических условиях, где они встречаются от предгорий и склонов гор Джунгарского Алатау и Северного Тянь-Шаня до пустынной территории Балхаш-Алакольской котловины.

Нами изучались интродуцируемые виды рода *Iris* L., привлеченные в 2015–2019 годы живыми растениями из естественных местообитаний (предгорья Заилийского Алатау, Южное Прибалхашье), а также семенами по делектусному обмену, с целью восстановления коллекции видов рода *Iris* L. на участке лекарственных растений, изучения особенностей их сезонного развития, плодоношения и возможностей семенного размножения в условиях мелкоделяночного культивирования на территории ГБС.

При исследованиях использовались общепринятые интродукционные методы с небольшими их модификациями применительно к местным условиям.

В результате исследований установлено, что испытываемые виды ирисов хорошо переносят транслокацию. Все 4 вида, перенесенные в культуру корневищами, проходят нормальный цикл фенологического развития, цветут, 2 вида регулярно дают полноценные семена. Семенное размножение дикорастущих ирисов дает крайне низкие результаты, которые еще более усугубляются растянутым по годам циклом прорастания сеянцев, что опять-таки подтверждает вышеприведенные литературные данные об их низком потенциале семенного размножения. В то же время, некоторые опробованные нами варианты предпосевной обработки дают основание предполагать перспективность обработки более эффективных способов семенного размножения ирисов.

Ключевые слова: ирисы, интродукция, Казахстан.

M.S. Ramazanova, L.M. Grudzinskaya, N.G. Gemejiyeva

RSE REU "Institute of botany and phytointroduction" CFW MEGNR of the Kazakhstan,
Kazakhstan, Almaty, e-mail: r.madin.c@mail.ru

Introduction of Kazakhstan species of Irises

According to various sources 19 (22) species are found in the flora of Kazakhstan except 3 rare species (*Iris alberti* Regel, *I. ludwigii* Maxim, *I. tigridia* Bunge) and endemics *I. ludwigii*, *I. alberti*. Eight species are used in folk medicine. Most of the wild irises grow in southeast Kazakhstan in various environmental conditions where they are found from the foothills and slopes of Dzungarian Alatau and the North Tien Shan mountains up to the desert territory of the Balkhash-Alakol depression.

We studied introduced species of the genus *Iris* L. attracted in 2015–2019 by living plants from natural habitats (foothills of the Zailiysky Alatau, South. Balkhash) as well as, seeds by delectus exchange. In order to restore the collection of species belong to *Iris* L. on the site of medicinal plants have studied the features of their seasonal development, fruiting and seed propagation under conditions of small plot cultivation in the territory of MBG.

In the studies have been used generally accepted introduction methods with their slight modifications as applied to local conditions.

As a result of studies, it was found that the tested species of irises tolerate translocation well. All 4 species transferred to the culture by rhizomes undergo a normal cycle of phenological development, flowering, 2 species regularly give matured seeds. Seed propagation of wild irises gives extremely low results which are further exacerbated by the seedling germination cycle extended over the years that again confirms the above literature data on their low seed reproduction potential. At the same time, some of the pre-sowing treatment options that we tested give reason to believe that it is promising to develop more effective methods for seed propagation of irises.

Key words: irises, introduction, Kazakhstan.

М.С. Рамазанова, Л.М. Грудзинская, Н.Г. Гемеджиева
ҚР ЭГТРМ ОШЖДК «Ботаника және фитоинтродукция институты» ШЖҚ РМК,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: r.madin.c@mail.ru

Қазақстандық құртқашаш түрлерін жерсіндіру

Әр түрлі деректерге сүйенсек, Қазақстан флорасында құртқашаштың 19 (22) түрі кездеседі, оның ішінде 3 түрі (*Iris alberti* Regel, *I. ludwigii* Maxim, *I. tigridia* Bunge) сирек, *I. ludwigii*, *I. alberti* эндемикалық болып табылады. Дәстүрлі медицинада 8 түрі қолданылады. Жабайы құртқашаштың көпшілігі Қазақстанның оңтүстік-шығысында әр түрлі экологиялық жағдайда өседі, олар Жоңғар Алатауы мен Солтүстік Тянь-Шань тау бөктерімен Балқаш-Алакөл қазаншұңқырының шөлді аймағына дейін кездеседі.

2015–2019 жылдары (Іле Алатауының бөктері, Оңтүстік Балқаш) табиғи мекендейтін құртқашаш түрлері өсімдік күйінде жерсіндірілуге тартылып, сонымен қатар делектус бойынша тұқыммен алмасып, дәрілік өсімдіктер жер телімінде құртқашаш түрлерін қалпына келтіру мақсатында, олардың маусымдық дамуының ерекшеліктерін, БББ аумағында ұсақ бөлшектерде егу жағдайында тұқымның көбею мүмкіндіктері мен жемістенуі жерсіндіріліп зерттелді.

Зерттеулерде жалпы қабылданған жерсіндіру әдістемесімен жергілікті жағдайларға байланысты шамалы модефикациялық өзгертулер қолданылды.

Нәтижесінде сыналған құртқашаш түрлері транслокацияны жақсы көтереді. Өсімдік күйінде жерсіндірілуге тартылған барлық 4 түр фенологиялық даму кезеңінен өтеді және гүлдейді, 2 түрі үнемі толыққанды тұқым береді. Жабайы құртқашаш тұқымдарының көбеюі өте төмен нәтиже береді, өсіп келе жатқан көшеттердің өсіп-өнуі кезеңі, яғни жылдар бойы көшеттердің өсу кезеңінің ұзартылуы қиындатылады, жоғарыда келтірілген әдебиеттер олардың тұқымның өсу потенциалы төмен екендігі туралы тағы да растайды. Сонымен қатар, бізбен қарастырылған кейбір нұсқауларда егістікке дейінгі алдын ала өңдеу тәсілдері құртқашаш тұқымдарының көбеюінің тиімді тәсілі болып табылады.

Түйін сөздер: құртқашаштар, жерсіндіру, Қазақстан.

Сокращения и обозначения

ГБС – Главный ботанический сад; ИУИ – индекс успешности интродукции; ущ. – ущелье; г. – год; окр. – окрестность; страт. – стратификация; скариф. – скарификация; эксп. – экспедиция; репр. – репродуктивность; цв. – цветение; пл. – плодоношение; к. – куст; гп. – генеративный побег; ж. р. – живые растения, ЮП – Южное Прибалхашье.

Введение

Культура ирисов издревле привлекала внимание человека, она документально известна с конца 17 века в России. Дикорастущие казахстанские виды ирисов упоминаются в коллекциях крупнейших ботанических учреждений с середины 18 века.

По разным источникам во флоре Казахстана встречается 19 (22) видов с 3 редкими видами (*Iris alberti* Regel, *I. ludwigii* Maxim, *I. tigridia* Bunge), из которых *I. ludwigii* Maxim, *I. alberti* Regel являются эндемичными [1, 2, 3, 4]. В народной медицине применяются 8 видов [5]. Большая часть дикорастущих ирисов произрастает на юго-востоке Казахстана в различных экологических условиях, где они встречаются от

предгорий и склонов гор Джунгарского Алатау и Северного Тянь-Шаня до пустынной территории Балхаш-Алакольской котловины.

Из 22-х казахстанских видов ирисов в России выращивались в те годы 14 видов: *I. alberti* Regel, *I. halophila* Pall., *I. humilis* Georgi, *I. korolkowii* Regel, *I. ludwigii* Maxim., *I. pallasii* Fisch. ex Trevir., *I. pseudacorus* L., *I. pumila* L., *I. ruthenica* Ker Gawl, *I. scariosa* Willd. ex Link, *I. sibirica* L., *I. sogdiana* Bunge, *I. tenuifolia* Pall., *I. tigridia* Bunge [6, 7].

В настоящее время культура ирисов еще более популярна, чем в древности, так как более широко проводятся исследования по изучению дикорастущих ирисов, особенно в области содержания действующих веществ и их применения в практической медицине [8, 9].

Широко ведутся разработки по микроклональному размножению различных видов и сортов ирисов [10, 11, 12, 13]. Так, в работе S. Mopper [14] установлено, что солевая нагрузка сильно снижает клональное размножение у местных и интродуцированных ирисов, внедренные ирисы имели конкурентное преимущество перед местными видами, независимо от уровня солености окружающей среды.

Работы по отбору полезных видов ирисов и привлечению их в культуру широко ведутся

в Турции, Китае, России, Азербайджане и др. странах Дальнего и Ближнего зарубежья [15, 16, 17, 18, 19].

Особенности развития аборигенных видов ирисов в условиях культуры обсуждаются в трудах зарубежных ученых. В частности, в работе Т.В. Елисафенко [20] приведены сведения о том, что особи *I. humilis* в условиях интродукции становятся малолетними, их популяции неустойчивы в культуре. Размножение в условиях культуры возможно только лабораторно-теплично-грунтовым способом и делением корневища.

Некоторые особенности онтогенеза *I. scariosa* отражены в работе Л.А. Инджеевой и Н.М. Бакташевой [21], установивших продолжительность фаз фенологического и онтогенетического развития, а также особенности семенного размножения этого вида. Среди важных биологических особенностей исследуемого вида указаны: высокая оптимальная температура прорастания семян (от +18°C до +25°C), наилучшая всхожесть 1,5–летних семян, низкий потенциал вегетативного размножения и продолжительность жизни не более 6–7 лет.

В работе D. I. Nan [22] выявлена существенная роль субстрата и удобрения на развитие и характеристики *I. adriatica* Trinajstic ex Mitic. В то же время, в эксперименте S. Volis [23] по переносу *I. atrofusca* Baker в новую среду обитания характеристики почвы и задерненность участка не оказали существенного влияния на развитие и производительность транслоцированных ирисов.

Сведения об интродукционных исследованиях казахстанских видов ирисов в Республике очень ограничены. К 1990 году 5 видов ирисов культивировались в качестве декоративных или редких культур в Алтайском ботаническом саду (*I. alberti*, *I. bloudowii*, *I. humilis*, *I. ruthenica*, *I. sibirica*), 3 вида – в Карагандинском ботаническом саду (*I. alberti*, *I. pumila*, *I. sibirica*), 2 вида – в Жезказганском ботаническом саду (*I. pumila*, *I. sibirica*). Больше всего казахстанских ирисов (11 видов) испытано в Главном ботаническом саду (ГБС). Часть из них привлечена корневищами из природных местообитаний: *I. alberti*, *I. halophila*, *I. Loczyi* Kanitz, *I. ruthenica*, *I. sogdiana* (хр. Заилийский Алатау), *I. scariosa* (хр. Кетмень), *I. korolkowii* (хр. Таласский Алатау), *I. pallasii* (пойма р. Иле), остальные виды получены по делектусному обмену. В предгорной зоне Заилийского Алатау в ГБС большинство выше перечисленных видов хорошо приживаются, цветут, дают полноценные семена. Интродукционные

популяции стабильны, но не обновляются самостоятельно. Малоперспективны в нашей зоне *I. ludwigii*, *I. ruthenica*, *I. tenuifolia*, которые не плодоносят или быстро выпадают [24].

Особенности культивирования *in vitro* некоторых видов и гибридов рода *Iris* L. описаны в работах М.М. Ишмуратовой [25, 26], а особенности онтогенеза *I. kolpakowskiana* Regel приведены в статье И.А. Съединой [27].

Цель настоящей работы – привлечение в культуру дикорастущих видов рода *Iris* L. из естественных местообитаний для восстановления коллекции видов рода *Iris* L. на участке лекарственных растений, изучение особенностей их сезонного развития, плодоношения и возможности семенного размножения в условиях мелкоделяночного культивирования на территории ГБС.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований явились интродуцируемые виды рода *Iris* L., привлеченные в 2015–2019 годы живыми растениями (корневищами) из естественных местообитаний (предгорья Заилийского Алатау, Южное Прибалхашье) и семенами по делектусному обмену.

При исследованиях использовались общепринятые интродукционные методы, применяемые в ботанических садах [28, 29], с небольшими их модификациями применительно к местным условиям. На основании многолетних наблюдений и в соответствии с жизненным состоянием коллекционных растений рассчитан индекс успешности интродукции вида (ИУИ), изменяющийся от 1 до 6 [30]. Систематика семейств дана в соответствии с системой APG IV (Angiosperm Phylogeny Group) [31, 32]. Для определения родовой и видовой принадлежности использованы интернет ресурсы Плантариум и The Plant List [33, 34].

Результаты исследований и их обсуждение

В течение 2015–2019 гг. удалось привлечь в коллекцию 4 казахстанских видов: *I. alberti*, *I. bloudowii*, *I. pallasii*, *I. sogdiana*, перенесенных корневищами из природных популяций, а *I. aphylla* L. – семенами из ботанического сада г. Кемерово (таблица 1). Установлено, что приживаемость вегетативного материала очень высокая, особенно при поздне-летней или ранне-осенней посадке (100% у всех видов). При поздне-весенней посадке корневищ приживаемость материала несколько снижается (до 80%),

что вполне объясняется фазой активной вегетации посадочного материала. Сохранность всех видов на 2–3 год жизни 100%-ная.

Всхожесть исходных семян ирисов очень низкая. Из испытанных 6–и видов, лабораторная всхожесть для 5–и видов вообще равна 0%. Применение различных методов предобработки семян (промораживание, скарификация) дало положительный эффект только для *I. pallasii*, семена которого при скарификации повысили лабораторную всхожесть до 10%. Только один вид – *I. sogdiana* показал лабораторную всхожесть исходных семян 4–6%, а семян собственной репродукции в 2016 и 2017 годах соответственно – 40 и 60% (таблица 2). Оказалось, что полевая всхожесть исходных семян несколько выше,

чем лабораторная и очень видоспецифична. *I. alberti* при осеннем посеве показал грунтовую всхожесть 4%, семена *I. aphylla* при весеннем посеве взошли на 5%, а семена *I. chrysographes* Dykes при аналогичных условиях в год посева не взошли. Семена *I. pallasii* и *I. sogdiana* без предобработки взошли всего на 2% через год после посева, независимо от сроков посева. А вот предварительно замороженные семена этих же видов показали 14 и 18% всхожести уже в год посева, весной следующего после посева года, дополнительно взошли еще 12 и 20% этих семян, единичные проростки *I. sogdiana* появились и весной 3-го года (таблица 1 и 2). Появление всходов у ирисов растягивается на весь вегетационный сезон.

Таблица 1 – Виды ирисов, привлеченные в коллекцию лекарственных растений

Вид, условия посева	Происхождение, год	Материал	Условия посева или посадки	Масса семян	Полевая всхожесть, приживаемость %	Сохранность на 2-й год, %	Отрастание на 3 год, %	Цветение, плодоношение
<i>Iris alberti</i>	Заилийский Алатау, 2018	ж. р.	осенняя посадка	63,4	100	100	–	+
– " – посевной ящик	– " –	семена	осенний посев	–	4	–	–	–
– " –	уц. Шамалган Заилийского Алатау, 2019	–	–	60,67	–	–	–	–
<i>I. aphylla</i> посевной ящик	РФ, Кемерово	семена	весенний посев	18,15	5	–	–	–
<i>I. bloudowii</i>	Заилийский Алатау, 2018	ж. р.	осенняя посадка	31,93	100	100	–	++
<i>I. chrysographes</i>	РФ, Кемерово	семена	весенний посев	9,8	0	–	–	–
<i>I. pallasii</i>	пойма р. Иле, ЮП, 2015	ж. р.	осенняя посадка	–	100	100	100	++
– " –	пойма р. Иле, ЮП, 2016	ж. р.	летняя посадка	–	100	100	100	++
– " –	пойма р. Иле, ЮП, 2017	ж. р.	весенняя посадка	–	80	100	100	++
– " – посевной ящик	пойма р. Иле, ЮП, 2015	семена	промораж. скариф.	18,25	14	+12	–	–
– " – парник, с 2016 г.	пойма р. Иле, ЮП, 2016	семена	осенний посев	–	0	–	–	–
– " – с 2016 г. взошли в 2019 г.	пойма р. Иле, ЮП, 2016	семена	страт. 1год	–	2	–	–	–
<i>I. sogdiana</i>	пойма р. Иле, ЮП, 2016	ж. р.	летняя посадка	–	100	100	100	++
– " –	пойма р. Иле, ЮП, 2015	ж. р.	осенняя посадка	–	100	100	100	++

Вид, условия посева	Происхождение, год	Материал	Условия посева или посадки	Масса семян	Полевая всхожесть, приживаемость %	Сохранность на 2-й год, %	Отростание на 3 год, %	Цветение, плодоношение
– " – посевной ящик, с 2015 г.	пойма р. Иле, ЮП, 2015	семена	промораж. скариф.	–	18	+20	–	–
– " – парник, с 2015 г.	пойма р. Иле, ЮП, 2015	семена	осенний посев	–	0	–	–	–
– " – парник, с 2016 г.	пойма р. Иле, ЮП, 2016	семена	осенний посев	–	0	–	–	–
" – с 2016 г. взошли в 2019 г.	пойма р. Иле, ЮП, 2016	семена	страт. год	–	2	–	–	–

Масса 1000 семян внутри вида колеблется незначительно, независимо от их происхождения: масса природных семян *I. pallasii* колеблется от 17,2 до 18,4 г, интродуцированные растения этого вида дают семена массой 18,1–19,1 г, масса природных семян *I. sogdiana* колеблется чуть больше, от 22,1 до 27,8 г, а интродуцированных – от 26,2 до 31,4 г (таблица 2).

Как уже указывалось выше, живыми растениями (корневищами) привлечены 4 вида ирисов. *I. alberti* Regel – привлечен в начале осени 2018 г. корневищами из ущ. Шамалган Заилийского Алатау. Приживаемость корневищ 100%-ная, весной следующего года отросли все привезенные растения, начало вегетации у разных экземпляров зафиксировано 11–20 марта, начало цветения – 23–29 апреля, продолжительность цветения вида в целом – около 30 дней, семена не завязались, конец вегетации вида – 1 октября. Одно гнездо *I. alberti* дает 1–2 генеративных по-

бега высотой 38–45 см, по 1–3 цветка, завязь не образовалась, максимальная длина вегетационного периода 198 дней (таблица 3).

I. bloudowii Ledeb. – привлечен осенью 2018 г. корневищами из поймы р. Куркаркара хр. Терской Алатау. Приживаемость корневищ 100%-ная, весной следующего года отросли все привезенные растения, начало вегетации в среднем 23 марта, начало цветения – 18–26 апреля, продолжительность цветения вида – 25 дней, семена созревают в 3 декаде июня (57–65 дней), заканчивают вегетацию в середине сентября, минимальная длина вегетационного периода (созревание семян) 95 дней, максимальная – 180 дней. Одно гнездо *I. bloudowii* формирует 2–4 генеративных побега высотой 29–40 см, по 2–3 цветка, по 1 коробочке (таблица 3). В коробочке формируется по 17–20 семян, масса семян – 31,93 г, продуктивность семян с 1 растения 0,543–0,638 г.

Таблица 2 – Продуктивность и качество семян

Вид	Происхождение, год	Масса 1000 семян, г	Лабораторная всхожесть, %		Полевая всхожесть, %	Продуктивность семян, г
			без пред-обработки	с пред-обработкой		
<i>Iris alberti</i>	эксп. 2018 – Заилийский Алатау	63,4	0	–	4	–
– " –	эксп. 2019 – Заилийский Алатау	60,67	0	–	–	–
<i>I. aphylla</i>	РФ, Кемерово	18,15	0	–	–	–
<i>I. bloudowii</i>	репр. 2019	31,93	–	–	–	0,543–0,638
<i>I. chrysographes</i>	РФ, Кемерово	9,8	0	–	–	–
<i>I. pallasii</i>	эксп. 2015 – пойма р. Иле, ЮП	17,2–18,4	0	10 – скар.	14+12	–
– " –	эксп. 2016 – пойма р. Иле, ЮП	18,5–18,8	–	–	–	–
– " –	репр. 2018	18,1–19,1	–	–	–	1,089–4,534
<i>I. sogdiana</i>	эксп. 2013 – Шу	22,1–27,8	6	–	–	–

Вид	Происхождение, год	Масса 1000 семян, г	Лабораторная всхожесть, %		Полевая всхожесть, %	Продуктивность семян, г
			без пред-обработки	с пред-обработкой		
– " –	эксп. 2015 – пойма р. Иле, ЮП	24,6–27,4	4	10 – скар.	18+20	3,523
– " –	эксп. 2016 – пойма р. Иле, ЮП	27,2–27,4	–	–	–	–
– " –	репр. 2016	26,2–29,6	0–40	–	–	1,799–2,366
– " –	репр. 2017	27,2–28,6	60–60	–	–	0,889–1,332
– " –	репр. 2018	29,8–31,4	–	–	–	2,188–15,195

I. pallasii Fisch. ex Trevir. – привлечен осенью 2015 г. корневищами из поймы р. Иле (Южное Прибалхашье), позднее привлекался в разные сроки (весной и летом). Приживаемость корневищ в зависимости от срока посадки 80–100%-ная, весной следующего года отросли все привезенные растения, начало вегетации по годам 12–26 марта, начало цветения – 6–20 мая, продолжительность цветения вида – 20–25 дней, семена созревают в 1 декаде августа (73–85 дней), растения заканчивают вегетацию в октябре, минимальная длина вегетационного периода (созревание семян) 142 дня, максимальная – 223 дня. Одно гнездо *I. pallasii* формирует 1–4 генеративных побега высотой 56–80 см, по 1–6 цветков, по 1–3 коробочки (таблица 3). В коробочке формируется по 16–69 (в среднем – 40) семян, масса семян – 18,1–19,1 г, продуктивность семян с 1 растения 1,089–4,534 г.

I. sogdiana Bunge – привлечен осенью 2015 г. корневищами из поймы р. Иле (Южное Прибалхашье), в последующие годы привлекался в разные сроки (весной и летом). Приживаемость корневищ 100%-ная, весной следующего года отросли все привезенные растения, начало вегетации по годам 15–25 марта, начало цветения – 10–25 мая, продолжительность цветения вида по годам – 27–40 дней, семена созревают в середине-конце августа (75–85 дней), растения заканчивают вегетацию в начале октября, минимальная длина вегетационного периода (созревание семян) 143 дня, максимальная – 203 дня. Одно гнездо *I. pallasii* формирует 1–2 генеративных побега высотой 67–110 см, по 1–2 цветка, по 1 коробочке (таблица 3). В коробочке формируется по 41–73 (в среднем – 56) семянки, масса семян варьирует по годам от 27,6–31,4 г, продуктивность семян с 1 растения по годам 0,889–15,195 г.

Таблица 3 – Фенологические показатели видов рода *Iris* L.

Вид	Параметры	Начало вегетации	Начало цветения	Конец цветения	Начало плодоношения	Конец вегетации	Длина вегетационного периода, дни	
							min	max
<i>Iris alberti</i>	к.: 1–2 гп. х 38–45 см, 1–3 цв.	11–20.03	23–29.4	22.5	нет	1.10	–	198
<i>I. bloudowii</i>	к.: 2–4 гп. х 29–40 см, 2–3 цв., 1 пл.	23.3	18–26.4	13.5	23–27.6	20.9	95	180
<i>I. pallasii</i>	к.: 1–4 гп. х 56–80 см, 1–6 цв., 1–3 пл.	12–26.3	6–20.5	30.5–8.6	1–9.8	28.10	142	223
<i>I. sogdiana</i>	к.: 1–2 гп. х 67–110 см, 1–2 цв., 1 пл.	15–25.3	10–25.5	7.6–9.7	9–25.8	5–18.10	143	203

Заключение

Первичная интродукция казахстанских видов ирисов в предгорной зоне Заилийского Алатау

(ГБС) оказалась достаточно успешной, несмотря на разные эколого-климатические условия обитания исходных образцов видов. Испытываемые виды ирисов хорошо переносят транслокацию,

первые годы культуры существенных выпадов не наблюдалось. Все 4 вида, перенесенные в культуру корневищами, проходят нормальный цикл фенологического развития, цветут, 2 вида регулярно дают полноценные семена.

Кратковременность проведенных исследований пока не дает оснований уверенно рекомендовать эти виды ирисов в массовую культуру, тем более, что литературные данные свидетельствуют о неустойчивости интродукционных популяций и сокращении продолжительности жизни дикорастущих ирисов в культуре, особенно привлеченных ускоренным способом (взрослыми живыми растениями) [19, 20].

Семенное размножение дикорастущих ирисов дает крайне низкие результаты, которые еще более усугубляются растянутым по годам циклом прорастания семян, что опять-таки подтверждает вышеприведенные литературные

данные об их низком потенциале семенного размножения. В то же время, некоторые опробованные нами варианты предпосевной обработки дают основание предполагать перспективность отработки более эффективных способов семенного размножения ирисов.

Конфликт интересов. Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования. Настоящая работа выполнялась в рамках научно-технической программы 0.0860 по теме: № 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 Флора Казахстана. – Алма-Ата, 1958. – Т. 2. – С. 233–246. – 1961. – Т. 5. – С. 496–497.
- 2 Абдулина С. А. Список сосудистых растений Казахстана / под редакцией Р. В. Камелина. – Алматы, 1999. – С. 106–107.
- 3 Байтенов М.С. Флора Казахстана в 2-х т. – Т.2. Родовой комплекс флоры. – Алматы: Ғылым, 2001. – С. 54.
- 4 Красная книга Казахстана. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – Том 2: Растения (колл. авторов). – Астана, ТОО «ArtPrintXXI», 2014. – С. 335–337.
- 5 Аннотированный список лекарственных растений Казахстана: Справочное издание / Л.М. Грудзинская, Н.Г. Гемеджиева, Н.В. Нелина, Ж.Ж. Каржаубекова. – Алматы, 2014. – С. 86–87.
- 6 Алексеева Н.Б. Итоги интродукции видов *Iris L.* (Iridaceae) флоры России и перспективы использования // Сборник статей ботанических исследований в Азиатской России. – Барнаул. – 2003. – Т. 3. – С. – 137–138.
- 7 Алексеева Н.Б. История интродукции дикорастущих видов *Iris* (Iridaceae) флоры России. Режим доступ: <https://www.binran.ru/files/publications/Proceedings/Proceedings-300-years/>.
- 8 Abdel Nasser B. Singab, Iriny M. Ayoub, Mohamed El-Shazly, Michal Korinek, Tung-Ying Wu, Yuan-Bin Cheng, Yang-Chang Wu. Shedding the light on Iridaceae: Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. *Industrial Crops and Products*. – 15 December 2016. – Vol. 92. – P. 308–335.
- 9 Roger B., Jeannot V., Fernandez S., Cerantola J. Characterisation and Quantification of Flavonoids in *Iris germanica L.* and *Iris pallida Lam.* Resinoids from Morocco. *Phytochemical Analysis*. – September/October 2012. – Vol.23. – Issue 5. – P. 450–455.
- 10 Shibli, R.A., Ajlouni, M. Somatic embryogenesis in the endemic black iris. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61, 15–21 (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1006468122819>.
- 11 Болтенков Е.В. Изучение особенностей культивирования *in vitro* тканей дальневосточных видов рода *Iris L.* (Iridaceae) для использования в биотехнологии. Автореферат. дис. канд. биол. наук / Е.В. Болтенков – Владивосток, 2002. – 24 с.
- 12 Тихомирова Л.И. Особенности введения в культуру *in vitro* ириса сибирского (*I. sibirica L.*). // *Аграрная наука сельскому хозяйству*. Сб. статей V Междунар. научно – практ. конф. – Барнаул, 2010. – Книга 2. – С. 380–383.
- 13 Тихомирова Л.И. Получение растений-регенерантов ириса из изолированных зародышей в условиях *in vitro* // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. 2010. – № 7 (69). – С. 45–49.
- 14 Mopper Susan, Wiens Karen C. and Goranova Greta A. Competition, salinity, and clonal growth in native and introduced *Iris*s. *American journal of botany*. – sep. 2016 – vol. 103 (9). – p. 1575–1581.
- 15 Kizil, S., Khawar, K.M. and Arslan, N. (2015). Introduction of Economically Important Bulbous Plants Collected from Wild Flora in SemiArid Climatic Conditions of Southeastern Anatolian Region of Turkey. *ActaHortic*. 1077, 143–153. DOI: 10.17660/ActaHortic. 2015.1077.15 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1077.15>.
- 16 Guo C. X., Zhou, Y., Dong Y. F., Chen F.Z., Tong J., Tong Z.F., Xu H.L., Tan Q. Introduction and Drought-Resistance Evaluation of Ten *Iris* Species. *International Conference on Germplasm of Ornamentals. Acta Hortic*. – 2013. – 977. – P. 75–82.
- 17 Селиверстова Е. Н., Щегринцев Н. В. Коллекционный фонд семейства Касатиковых (Iridaceae) в Ставропольском ботаническом саду // *Вестник АПК Ставрополя*. – 2017. – Вып. 2. – С. 194–196.
- 18 Интродукция лекарственных, ароматических и технических растений. Итоги работ интродукционного питомника БИН АН СССР за 250 лет. – М.-Л., 1965. – С. 152–156.

- 19 Дадашева, Л.К., Ибадлы, О.В. Состояние ценопопуляций некоторых редких видов родов *Tulipa* и *Iris* на северо-востоке Азербайджана // Ботанический журнал. – 2010. – Т.95. – Вып. 12. – С. 1737–1742.
- 20 Елисафенко Т.В. Особенности онтогенеза *Iris humilis* (Iridaceae) в естественных условиях в Центральном Алтае и в условиях интродукции в г. Новосибирске. Растительные ресурсы. – 2010. – Т. 46. – Вып. 4. – С. 21–34.
- 21 Инджеева Л. А., Бакташева Н. М. Биологические особенности и структура природных ценопопуляций *Iris scariosa* Willd. ex Link в республике Калмыкия Вестник Калмыцкого института гуманитарных исследований РАН. – 2013. – № 2. – С.135–138.
- 22 Dovedan Ines Han, Moric Sanja, Sindrak Zoran, Cerovski Ivana, Mustac Ivan, Goga Lepomir, Poje Miroslav. Influence of Substrate and Fertilization on Growth and Development of *Iris adriatica*. Not Bot Horti Agrobo. – 2012. – 40 (1). – P. 212–215.
- 23 Volis Sergei, Dorman Michael, Blecher Michael, Sapir Yuval, Burdeniy Lev. Variation partitioning in canonical ordination reveals no effect of soil but an effect of co-occurring species on translocation success in *Iris atrofusca*. Journal of Applied Ecology. – 2011. – 48. – P. 265–273.
- 24 Растения природной флоры Казахстана в интродукции. Справочник. – Алма-Ата. «Гылым», 1990. – 287 с.
- 25 Ишмуратова М.М. Особенности культивирования *in vitro* растений различных экологических групп на примере видов рода *Iris* L. // Раст. ресурсы. – 1999. – Т. 35. – С. 67–74.
- 26 Ишмуратова М.М., Рахимова А.Ф. Использование культуры *in vitro* для размножения гибридов *Iris* L. II Растит. ресурсы. – 1999. – Т. 35. – С. 74–78.
- 27 Съедина И. А., Отрадных И. Г. Феноритмы редких декоративных травянистых растений Северного Тянь-Шаня в Альпинарии ботанического сада Алматы // Сохранение разнообразия растительного мира в ботанических садах: традиции, современность, перспективы: мат. Междунар. конф., посвященной 70-летию ЦСБС (Новосибирск, 1–8 августа 2016). – Новосибирск. – 2016. – С. 288–289.
- 28 Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР. – М., 1983. – 27 с.
- 29 Методика исследований при интродукции лекарственных растений. – М., 1989. – 39 с.
- 30 Грудзинская Л.М. Интродукционный анализ растений семейства Fabaceae Lindl. Сб. Ботанические исследования Сибири и Казахстана. – Кемерово. – 2009. – Вып. 5. – С. 94–102.
- 31 An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV // Botanical Journal of the Linnean Society. – May 2016. – Vol. 181. – Issue 1. – P. 1–20.
- 32 Современные системы цветковых растений /Modern systems of flowering plants Botanicheskiy Zhurnal. – July 2019. – 104(4). – P. 503–527.
- 33 The Plant List. 2013. Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>.
- 34 Plantarium: otkrytyy onlayn atlas-opredelitel rasteniy i lishaynikov Rossii i sopredelnykh stran. 2007–2020. [Plantarium: an open online atlas identifier of plants and lichens in Russia and neighboring countries]. <http://www.plantarium.ru/>. (In Russian).

References

- 1 Flora Kazakhstan (1958), – vol. 2, – pp. 233–246. (1961) Alma-Ata, vol. 5, pp. 496–497.
- 2 Abdulina S.A. (1999) Spisok sosudistyykh rasteniy Kazakhstan [List of vascular plants in Kazakhstan] pod redaktsiyey R.V. Kamelina. – Almaty, pp. 106–107.
- 3 Baitenov M.S. (2001) Flora of Kazakhstan in 2 vol. Generic complex of flora. – Almaty: Gylym, vol. 2, p. 54.
- 4 Krasnaya kniga Kazakhstan (2014) [The Red Book of Kazakhstan]. Izd. 2–ye, pererabotannoye dopolnennoye – vol. 2. – Rasteniya (koll. avtorov). – Astana. – TOO «AptPrintXXI», pp. 335–337.
- 5 L.M. Grudzinskaya, N. G. Gemejyeva, N. V. Nelina, ZH. ZH. Karzhaubekova (2014) Annotirovannyy spisok lekarstvennykh rasteniy Kazakhstan [Annotated list of medicinal plants of Kazakhstan] /Spravochnoye izdaniye. Almaty, pp. 86–87.
- 6 Alekseyeva N.B. (2003) Itogi introduktsii vidov *Iris* L. (Iridaceae) flory Rossii i perspektivy ispol'zovaniya [Results of the introduction of species of *Iris* L. (Iridaceae) of the flora of Russia and prospects for use]. Sbornik statey botanicheskikh issledovaniy v Aziatskoy Rossii. Barnaul, vol. 3, pp. 137–138.
- 7 Alekseyeva N.B. Istoriya introduktsii dikorastushchikh vidov *Iris* (Iridaceae) flory Rossii. [History of introduction of wild species of *Iris* (Iridaceae) from flora of Russia]. (accessed: <https://www.binran.ru/files/publications/Proceedings/Proceedings – 300 – years>).
- 8 Abdel Nasser B. Singab, Iriny M. Ayoub, Mohamed El-Shazly, Michal Korinek, Tung-Ying Wu, Yuan-Bin Cheng, Yang-Chang Wu. (DEC 15. 2016) Shedding the light on Iridaceae: Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. Industrial crop and products, vol. 92, pp. 308–335.
- 9 Roger B., Jeannot V., Fernandez S., Cerantola J. (sep-oct. 2012) Characterisation and Quantification of Flavonoids in *Iris germanica* L. and *Iris pallida* Lam. Resinoids from Morocco. Phytochemical analysis, vol. 23, issue 5, pp. 450–455.
- 10 Shibli, R.A., Ajlouni, M. (2000) Somatic embryogenesis in the endemic black iris. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 61, pp. 15–21. <https://doi.org/10.1023/A:1006468122819>.
- 11 Boltenev E.V. (2002) Izucheniye osobennostey kul'tivirovaniya in vitro tkaney dal'nevostochnykh vidov roda *Iris* L. (Iridaceae) dlya ispol'zovaniya v biotekhnologii. [Study of features of *in vitro* tissues cultivation of Far Eastern species of *Iris* L. genus (Iridaceae) for use biotechnology]. Tekst.: Avtoref. Dis. candidate of biological Sciences / E.V. Boltenev –Vladivostok, p. 24.
- 12 Tikhomirova L.I. (2010) Osobennosti vvedeniya v kul'turu in vitro irisa sibirskogo (*I. sibirica* L.) [Features of the introduction of *in vitro* culture of *Iris sibirica* (*I. sibirica* L.)]. Agrarnaya nauka sel'skomu khozyaystvu. Sbornik statey V Mezhdunarodnoy nauchno – prakticheskoy konferentsii. – Barnaul. – Book 2, pp. 380–383.

- 13 Tikhomirova L.I. (2010) Polucheniye rasteniy-regenerantov irisa iz izolirovannykh zarodyshey v usloviyakh in vitro [Obtaining Iris regenerated plants from isolated embryos in vitro]. Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, no 7 (69), pp. 45–49.
- 14 Mopper Susan, Wiens Karen C., Goranova Greta A. (sept. 2016) Competition, salinity, and clonal growth in native and introduced Irises. American Journal of botany, vol. 103, issue 9, pp.1575–1581.
- 15 Kizil, S., Khawar, K.M. and Arslan, N. (2015). Introduction of Economically Important Bulbous Plants Collected from Wild Flora in SemiArid Climatic Conditions of Southeastern Anatolian Region of Turkey. ActaHortic. 1077, 143–153. DOI: 10.17660/ActaHortic. 2015.1077.15 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1077.15>.
- 16 Guo C. X., Zhou, Y., Dong Y. F., Chen F.Z., Tong J., Tong Z.F., Xu H.L., Tan Q. (2013) Introduction and Drought-Resistance Evaluation of Ten Iris Species. International Conference on Germplasm of Ornamentals. Acta Hortic. – 977, pp. 75–82.
- 17 Seliverstova E.N., Shchegrinets N.V. (2017) Kollektсионnyy fond semeystva Kasatikovykh (Iridaceae) v Stavropol'skom Botanicheskom sadu [Iridaceae family collection fund in Stavropol botanical garden]. Vestnik APK Stavropol'ya, vol. 2, pp. 194–196.
- 18 Introduktsiya lekarstvennykh, aromaticsikh i tekhnicheskikh rasteniy (1965) [Introduction of medicinal, aromatic and industrial plants]. Itogi robot introduktsionnogo pitomnika BIN AN SSSR za 250 let. M. – L., pp. 152–156.
- 19 Dadasheva L.K., Ibadly O.V. (2010) Sostoyaniye tcenopopulyatsiy nekotorykh redkikh vidov rodov Tulipa i Iris na severo-vostoke azerbaydzhana [Status of center populations of some rare species of the genus Tulipa and Iris in the northeast of Azerbaijan]. Botanical Journal, vol. 95, issue 12, pp. 1737–1742.
- 20 Elisafenko T.V. (2010) Osobennosti ontogeneza Iris humilis (Iridaceae) v yestestvennykh usloviyakh v Tsentral'nom Altaye i v usloviyakh introduktsii v g. Novosibirsk. [Features of the ontogenesis of Iris humilis (Iridaceae) in vivo in Central Altai and under conditions of introduction in Novosibirsk]. Rastitel'nye resursy, vol. 46, issue 4, pp. 21–34.
- 21 Indzheyeva L.A., Baktasheva N.M. (2013) Biologicheskiye osobennosti i struktura prirodnykh tcenopopulyatsiy Iris scariosa Willd. ex Link v respublike Kalmykiya [Biological features and structure of natural coenopopulations of Iris scariosa Willd. ex Link in the Republic of Kalmykia]. Vestnik Kalmytskogo instituta gumanitarnykh issledovaniy RAN, no 2, pp. 135–138.
- 22 Dovedan, Ines Han; Moric, Sanja; Sindrak, Zoran (jan-jun 2012) Influence of substrate and fertilization on growth and development of Iris adriatica. Notulae botanicae horti agrobotanici cluj-napoca, vol. 40, issue 1, pp. 212–215.
- 23 Volis Sergei, Dorman Michael, Blecher Michael, Sapir Yuval, Burdeniy Lev. (2011) Variation partitioning in canonical ordination reveals no effect of soil but an effect of co-occurring species on translocation success in Iris atrofusca. J. Applied ecology, vol. 48, pp. 265–273.
- 24 Rasteniya prirodnoy flory Kazakhstana v introduktsii (1990) [Plants of the natural flora of Kazakhstan in the introduction]. Spravochnik. Alma-ata «Gylym», p. 287.
- 25 Ishmuratova M.M. (1999) Osobennosti kul'tivirovaniya in vitro rasteniy razlichnykh ekologicheskikh grupp na primere vidov roda Iris L. [Features of in vitro cultivation of plants of various ecological groups by the example of species of the genus Iris L.]. Rast. resursy, vol. 35, pp. 67–74.
- 26 Ishmuratova M.M., Rakhimova A.F. (1999) Ispol'zovaniye kul'tury in vitro dlya razmnozheniya gibridov Iris L. [Using an in vitro culture to propagate Iris L. hybrids]. II Rast. resursy, vol. 35, pp. 74–78.
- 27 S'edina I.A., Otradnih I.G. (2016) Fenoritmy redkikh dekorativnykh travyanistykh rasteniy Severnogo Tyan'-Shanya v Al'pinarij botanicheskogo sada Almaty [Phenorhythms of rare ornamental herbaceous plants of the Northern Tien-Shan in the rock gardens of the Almaty Botanical Garden]. Sokhraneniye raznoobraziya rastitel'nogo mira v botanicheskikh sadakh: traditsii, sovremennost', perspektivy: mater. Mezhdunar. konf., posvyashchenoy 70-letiyu CSBS (Novosibirsk, 1–8 avgust). – Novosibirsk, pp. 288–289.
- 28 Metodika fenologicheskikh nablyudeniy v botanicheskikh sadakh SSSR (1983) [Methodology of phenological observations in the botanical gardens of the USSR]. – M., p. 27.
- 29 Metodika issledovaniy pri introduktsii lekarstvennykh rasteniy (1989) [Research technique for the introduction of medicinal plants]. – M., p. 39.
- 30 Grudzinskaya L.M. (2009) Introduktsionnyy analiz rasteniy semeystva Fabaceae Lindl. [Introduction analysis of plants of the family Fabaceae Lindl.]. Botanicheskiye issledovaniya Sibiri i Kazakhstana. Kemerovo, issue 15, pp. 94–102.
- 31 An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants (May 2016): APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, vol. 181, Issue 1, pp. 1–20.
- 32 Geltman D.V. (2019) Sovremennyye sistemy tsvetkovykh rasteniy [Modern flowering plant systems]. Botanical Journal, vol. 104, pp. 78–87.
- 33 The Plant List. 2013. Version 1.1. <http://www.theplantlist.org/>.
- 34 Plantarium: otkrytyy onlayn atlas-opredelitel rasteniy i lishaynikov Rossii i sopredelnykh stran 2007–2020. [Plantarium: an open online atlas identifier of plants and lichens in Russia and neighboring countries]. <http://www.plantarium.ru/>. (In Russian).

Л.Ш. Шадманова¹ , Г.Т. Ситпаева², Н. Фризен^{3,4}

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: laura_shadmanova@mail.ru

²Институт Ботаники и фитоинтродукции, Казахстан, г. Алматы

³Ботанический сад при Университете города Оснабрюк, Германия, г. Оснабрюк

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,
Россия, г. Москва

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ *MALUS SIEVERSII* ДЖУНГАРСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *IN SITU* И *EX SITU* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-PCR МАРКЕРОВ

Плодовые леса Тянь-Шаня определены как географическая область распространения диких сородичей многих ценных сельскохозяйственных культур, в числе которых особый интерес ученых представляет *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem – яблоня Сиверса. Природные популяции *M. sieversii* Казахстана, обладающие широким диапазоном генетических и фенотипических вариаций признаков, все больше подвергаются антропогенному прессингу и переопылению с культурными сортами. Известно, что для эффективного сохранения и рационального использования генетических ресурсов, требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают. Генетическое разнообразие 13 сортов-клонов яблони Сиверса джунгарской популяции из интродукционной коллекции Главного ботанического сада г. Алматы (Казахстан) и 31 образец из трех популяций Джунгарского Алатау были изучены с использованием ISSR-PCR межмикросателлитных маркеров и программы iMEC. Для оценки генетических взаимоотношений между изученными образцами были вычислены показатели ожидаемой гетерозиготности и средняя гетерозиготность образцов. В качестве основных мер с помощью iMEC рассчитаны величина информационного полиморфизма (PIC); различающая способность (D), эффективное мультиплексное отношение (E), маркерный индекс MI и разрешающая способность (R). В ходе работы выявлено высокое генетическое разнообразие как сорт-клонов, так и образцов *M. sieversii*, отобранных из обследованных нами ущелий. В результате PCA анализа изученные сорт-клоны и образцы *M. sieversii* из природных популяций образовали одно облако, что указывает на генетический обмен между этими популяциями.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, сорт-клоны яблони Сиверса, iMEC программа, ISSR-PCR, *Malus sieversii*, PCA анализ.

L.Sh. Shadmanova^{1,2}, G.T. Sitpayeva², G. Mukanova², N. Friesen^{3,4}

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: laura_shadmanova@mail.ru

²Sitpayeva Gulnara, Institute of Botany and Phytointroduction, Kazakhstan, Almaty

³Nikolai Friesen, Botanical Garden, University of Osnabruck, Germany, Osnabruck

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russia, Moscow

Evaluation genetic diversity of *Malus sieversii* of Dzungarian populations using ISSR-PCR markers

Fruit forests of Tien Shan are the centre of origin of several plant species. In this geographical region, many economically valuable species are distributed, such as *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem. – Sievers apple tree. The natural populations of *M. sieversii* of Kazakhstan with a wide range of genetic and phenotypic variations of characters are increasingly subjected to anthropogenic pressure and genetic erosion. It is known that for the effective conservation and rational use of genetic resources, a thorough assessment of the genetic variation that they possess is required. The genetic diversity of 13 clone varieties of *M. sieversii* of the Dzungarian population of The Main botanical garden's introduction collection in Almaty (Kazakhstan) and 31 samples from three populations was assessed using 8 polymorphic ISSR markers and iMEC program. To assess the genetic relationships between the studied samples, the expected heterozygosity and average heterozygosity of the samples were calculated. As basic measures, the polymorphism information content (PIC), distinguishing ability (D), effective multiplex ratio (E), marker index MI and resolution (R) were calculated using iMEC. The work revealed a high genetic diversity of

clone varieties and samples of the Dzungarian population. As a result of PCA analysis, the studied variety clones and *M. sieversii* samples from natural populations formed one cloud, which indicates a genetic exchange between these populations.

Key words: Clone-varieties of Sievers apple tree, iMEC program, ISSR-PCR, genetic diversity, *Malus sieversii*, PCA analysis.

А.Ш. Шадманова¹, Г.Т. Ситпаева², Н. Фризен^{3,4}

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.,
e-mail: laura_shadmanova@mail.ru

²Ботаника және фитоинтродукция институты, Қазақстан, Алматы қ.

³Оснабрюк қаласы Университетінің Ботаникалық бағы, Германия, Оснабрюк қ.

⁴И.М. Сеченов атындағы бірінші Мәскеу мемлекеттік медицина Университеті, Ресей, Мәскеу қ.

ISSR-PCR маркерлерін қолдана *Malus sieversii* Жоңғар популяциясының генетикалық алуантүрлілігін бағалау

Тянь-Шань тауларының жемісті ормандары көптеген құнды дақылдардың жабайы туыстарының географиялық таралу аймағы ретінде анықталған, ал олардың арасында ерекше қызығушылық тудыратын *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem – Сиверс алмасы. Генетикалық және фенотиптік белгілердің кең өзгергіштігіне ие *M. sieversii* түрінің табиғи популяциялары шамадан тыс антропогендік әсерге және мәдени сорттармен тозандануға соңғы кездері жиі ұшырауда. Генетикалық ресурстарды тиімді сақтау және дұрыс пайдалану үшін биологиялық алуантүрлілікті мұқият бақылау қажет екендігі белгілі. Жоңғар Алатауы Сиверс алма популяциясынан Алматының Бас ботаникалық бағына жерсіндірілген коллекциясының 13 сорт-клонының генетикалық алуантүрлілігі және Жоңғар Алатауының үш табиғи популяциясынан жиналған 31 нысаны ISSR-PCR микросаттелит аралық маркерлері мен iMEC бағдарламасы арқылы зерттелді. Зерттелген үлгілердің генетикалық байланысын бағалау үшін күтілетін гетерозиготалығы мен нысандардың орташа гетерозиготалығы есептелді. Негізгі өлшемдер ретінде ақпараттық полиморфизм мәні (PIC), маркердің айыру қабілеті (D), мультиплексті тиімді коэффициенті (E), MI маркер индексі және ажыратымдылық (R) iMEC көмегімен есептелді. Жұмыс барысында біз қарастырған шатқалдардан іріктелген *M. sieversii* нысаналары мен жерсіндірілген коллекция нысаналарының генетикалық әртүрлілігі анықталды. PCA талдауының нәтижесінде зерттелген сорт-клондар мен *M. sieversii* табиғи популяция нысандары бірегей бұлтты құрады, бұл осы популяциялар арасында генетикалық алмасу орын алатындығын көрсетеді.

Түйін сөздер: генетикалық алуантүрлілік, Сиверс алмасының сорт-клондары, iMEC бағдарламасы, ISSR-PCR, *Malus sieversii*, PCA талдау.

Введение

В связи с растущими требованиями к защите окружающей среды и безопасности пищевых продуктов при производстве высококачественных яблок, на сегодняшний день современная селекция яблонь становится все чаще зависимым от устойчивых генных ресурсов дикорастущих видов рода *Malus* Mill. [1]. Плодовые леса Тянь-Шаня определены как географическая область распространения диких сородичей многих ценных сельскохозяйственных культур, в числе которых особый интерес ученых представляет *Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem – яблоня Сиверса [2, 3]. Яблоня Сиверса считается эндемиком Центральной Азии [4, 5] и идентифицирован как главный прародитель культурной яблони – *Malus x Domestica* [6–10] на основании значительного сходства морфологических признаков плодов и форм деревьев, а также генетических данных.

Согласно флоре Казахстана и международной ботанической номенклатуре дикорастущий вид *M. sieversii* относится к роду *Malus* Mill. к семейству *Rosaceae* отряда *Rosales* класса *Magnoliopsida* [11, 12]. Ареалом распространения *M. sieversii* являются горные районы Казахстана, Кыргызстана, Узбекистана, Западного Китая [4, 13, 14, 15]. В Казахстане природные популяции вида встречаются в Заилийском, Джунгарском, Киргизском Алатау, в Каратау, в Таласском Алатау, самая северная точка ареала – Тарбагатай. Сплошные лесные массивы дикой яблони встречаются в казахстанской части Джунгарского Алатау, где оптимальные условия для их роста и плодоношения наблюдаются по северным склонам на высотах 900-1500м, а по южным склонам 1200-1600м над уровнем моря. Все представители вида – деревья до 12-14 м в высоту, с серо-коричневым или темно-серым стволом, имеют весьма разнообразные плоды по форме, окраске, вкусу и биохимическому составу.

Природные популяции *M. sieversii* Казахстана, обладающие широким диапазоном генетических и фенотипических вариаций признаков, все больше подвергаются антропогенному прессингу и переопылению с культурными сортами. За последние десятилетия площадь распространения яблони Сиверса сократилась в Джунгарском Алатау – на 30 %, а в Заилийском Алатау на 70%.

В настоящее время выделены генетические резерваты *M. sieversii* в естественных местах обитания, а также создан уникальный коллекционный фонд дикой яблони Сиверса на территории Главного ботанического сада г. Алматы (ГБС). Для создания интродукционной коллекции в качестве привоя по фенотипу были отобраны формы яблони Сиверса, ценные с практической точки зрения из естественных популяций горных лесов Республики еще в прошлом столетии и доведены до сортов-клонов методом окулировки на подвой яблони Сиверса. По мнению А. Д. Джангалиева [16], в условиях риска сокращения генетического разнообразия популяций *M. sieversii* важнейшими мерами их охраны является восстановление естественной генетической структуры популяций, что предполагает определенность формовой принадлежности каждого саженца, используемого в лесовосстановлении. Известно, что для эффективного сохранения и рационального использования генетических ресурсов, требуется тщательная оценка генетической изменчивости, которой они обладают [16].

Изучение генетического разнообразия основывается на морфологических, биохимических и молекулярных маркерах [17]. Молекулярные маркеры имеют значительные преимущества по сравнению с другими методами исследования, так как они более надежны, информативны и достоверны, к тому же факторы окружающей среды не влияют на полученный результат по молекулярным методам анализа [18]. В настоящее время особую актуальность приобретают исследования *M. sieversii* как в природных популяциях [13, 19-22], так и в искусственных ценозах [23, 24] с применением методов фрагментного анализа ДНК, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выявления полиморфизма ДНК широко используются межмитохондриальные маркеры (ISSR, Inter-Simple Sequence Repeat). Маркеры ISSR представляют собой универсальную систему генетических маркеров для анализа наследуемых изменений на уровне ядерной ДНК и широко используются в исследованиях генетического полиморфизма популяций человека, растений и животных [17]. Метод до-

статочно хорошо воспроизводим и может быть применен для выявления внутривидовой и межвидовой изменчивости, идентификации видов, популяций, сортов, линий и иногда индивидов [25, 26].

В данной работе представлены результаты изучения внутривидового разнообразия и генетических характеристик форм *M. Sieversii* из природных ценопопуляций и интродуцированных в Главном ботаническом саду г. Алматы сортов-клонов с использованием ISSR-маркеров.

Материалы и методы

Объектом для молекулярных исследований являлись 44 образца *M. Sieversii*. Листья для проведенного анализа были собраны из интродукционной коллекции яблони Сиверса и трех ущелий Джунгарского Алатау (ущ. Пихтовая, ущ. Мушабай, ущ. Крутое). С помощью GPS навигатора отмечены координаты местоположения каждого дерева для последующих исследований. Собраный материал был высушен в силикагеле.

Для выделения и очистки ДНК из растительного материала были использованы наборы реагентов innuPREP Plant DNA kit (Analytikjena, Германия), следуя инструкции производителя. Рабочую ДНК хранили при +4... +8 °С, часть хранили в морозильной камере.

Концентрацию и качество полученной ДНК определяли с помощью прибора MaxLife personal gene analyzer H100 (Barnaul, Russia), согласно протоколу производителя. Для идентификации аллелей и генетической дифференциации были использованы межмитохондриальные ISSR-PCR маркеры. Амплификация проводилась на термоциклере Termocycler (Professional Biometra, Германия) по стандартной для ISSR-PCR методу программе: денатурация 94,0 °С в течении 01:30 мин., 35 циклов в следующей повторности: 94,0 °С на 40 сек., 45,0 °С на 45 сек., 72,0 °С на 1 мин.; затем финальный цикл элонгации при 72,0 °С в течение 6 мин. Конечный объем смеси образца для ПЦР составлял 30 мкл реакционной смеси, содержащей по 1 мкл ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы, 3 мкл стандартного 10x буфера [27], 2 мкл dNTPs, 1 мкл 10 пМ праймера, 22 мкл двойной $disH_2O$.

Амплифицированные фрагменты ДНК проверяли с помощью электрофореза на 1,5 % агарозном, окрашенном бромистым этидием геле, визуализировали под UV лучами на аппарате Gel i X20 Imager (INTAS science imaging, Germany) и документировали с помощью принтера Mitsubishi P93D (Mitsubishi Elec. Corp., Japan).

Таблица 1 – ISSR праймеры и их статистические параметры

Праймер	Последовательность 5' – 3'	ОКФ*	КПФ*	Полиморфизм	H_E	PIС	EMR	H_{AVP}	MI	R
GR ₂₁₅	(CA) ₆ GT	22	21	95,5 %	0.45	0.39	7.61	0.00046	2.96	8.22
ISSR-1	(AC) ₈ T	14	13	95,5 %	0.48	0.37	5.79	0.00078	2.14	6.5
GR ₂₁₂	(CT) ₈ TG	12	10	83,3 %	0.47	0.38	4.72	0.0009	1.79	5.45
HB ₁₀	(GA) ₆ GG	19	15	78,9 %	0.42	0.4	13.1	0.00051	5.23	7.54
HB ₁₂	(CAC) ₃ GC	17	17	100 %	0.49	0.37	8.86	0.00066	3.28	8.91
UBC ₈₂₈	(TG) ₇ TA	15	14	95,5 %	0.44	0.39	5.06	0.00067	1.97	7.41
MAO	(CTC) ₄ RC	25	23	92 %	0.48	0.38	8.86	0.00049	3.36	9.72
UBC ₈₀₉	(AG) ₈ G	10	6	60 %	0.49	0.37	4.86	0.00114	1.76	3.73
Всего		134	119							
Средний уровень полиморфизма				87,6 %						

ОКФ* – общее количество фрагментов, КПФ* – количество полиморфных фрагментов

В ходе анализа составляли матрицу для обработки полученных электрофоретических спектров в программе Microsoft Excel на основе присутствия (1) или отсутствия (0) ампликонов одинаковой длины путем прикладывания линейки для каждого образца на фотографии электрофорезного геля. Были рассмотрены только четкие ISSR фрагменты с хорошей повторяемостью от 500 до 3500 б. п. длиной.

Матрицу проанализировали с помощью программы R ver. 3.2.2 (R Development Core Team 2008) на основе которого был проведен PCA-анализ (PCA- Principal component analysis).

На основании частот фрагментов ДНК также были вычислены основные показатели уровня генетического разнообразия образцов дикой яблони из Джунгарского Алатау с использованием программы iMEC (Online Marker Efficiency Calculator) (A. Amiryousefi et al., 2018). В качестве основных мер iMEC рассчитывает индекс гетерозиготности (H_E); величину информационного полиморфизма (PIС); различающую способность (D), эффективное мультиплексное отношение (E), маркерный индекс MI, среднее арифметическое значение гетерозиготности ($H_{авр}$) и разрешающую способность (R).

Результаты и обсуждение

Для подбора праймеров проводили экспериментальную амплификацию с использованием пяти образцов яблони Сиверса. Из 15 протестированных

маркеров 8 продемонстрировали высокий полиморфизм. В нашем исследовании ряд таких праймеров как 818, X10, M27, AGC6G, CA8R почти не амплифицировали полиморфных фрагментов (рис.1).

В результате использования наиболее эффективных 8 ISSR-PCR маркеров (табл. 1) на 44 образцах было идентифицировано 124 полиморфных ISSR фрагментов из 134 проанализированных ампликонов. В зависимости от праймера выявлено от 10 до 25 амплифицированных фрагментов ДНК (бэндов), размеры фрагментов варьировали от 500 до 3500 п.н. Праймер MAO оказался наиболее полиморфным. Минимальное количество фрагментов отмечено с использованием праймера UBC809, как и наименьшее число полиморфных локусов (60%). Наибольшее число полиморфных локусов у анализированных образцов выявлено с праймерами UBC828, HB12, GR215, составивших 95,5-100 % полиморфизма. В среднем уровень полиморфизма ISSR локусов, выявленный с помощью 8 праймеров, составил 87,6%. (табл. 3). ISSR-маркирование сортов-клонов выявило 115 фрагментов, из которых 91 были полиморфными ($P = 0,791$). Анализ электрофореграммы природной популяции яблони Сиверса показало 131 выявленных фрагментов ДНК, из которых 121 были полиморфными ($P = 0,923$).

Одним из основных параметров, определяющих меру информативности маркеров, является величина информационного полиморфизма (PIС). Значение PIС определяется способностью марке-

ра устанавливать полиморфизм в популяции в зависимости от количества обнаруженных аллелей и частоты их распределения [28]. Из чего следует, что значение PIC выявляет дискриминационную

способность маркера, которая равнозначна разнообразию гена. Для доминантных маркеров, таких как межмикросателлитные ISSR маркеры, значение PIC изменяется от 0 до 0,5.

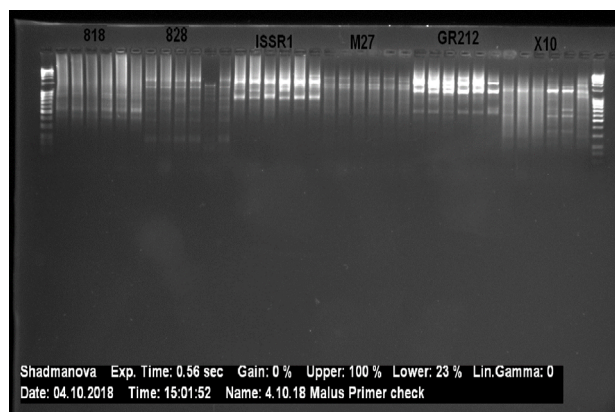


Рисунок 1 – Детекция амплифицированных фрагментов при тестировании ISSR маркеров (818, 828, ISSR1, M27, GR212, X10)

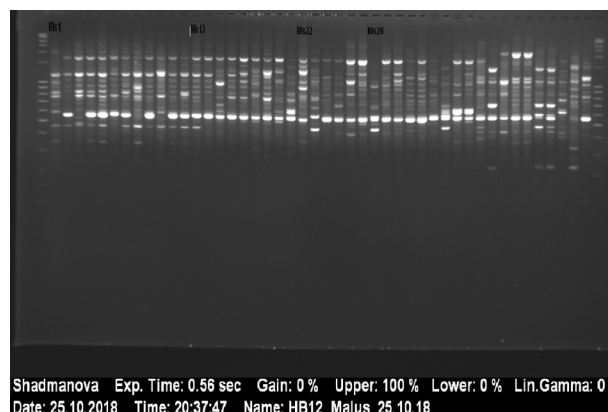


Рисунок 2 – Детекция амплифицированных фрагментов с помощью маркера HB12

В нашем исследовании значение PIC варьировало от 0.37 до 0.4 и в среднем составило 0.38. Наибольшее значение индекса выявлено для маркера HB10.

Также для 8 протестированных ISSR-PCR маркеров с помощью программы iMEC были подсчитаны значения эффективного мультиплексного отношения E (Effective multiplex ratio), маркерный индекс MI (Marker index). Параметры EMR и MI широко используются в многочисленных исследованиях с целью выявления информативного потенциала молекулярных маркеров [29]. Получены данные среднего арифметического значения гетерозиготности H_{AVR} (Mean heterozygosity), разрешающая способность R (Resolving power), а также индекс гетерозиготности H_E (Expected heterozygosity), где ожидаемая гетерозиготность определялась согласно формуле $H = 1 - \sum p_i^2$ (P_i – частота встречаемости аллелей). Ожидаемую гетерозиготность обычно определяют, когда описывают генетическое разнообразие, поскольку она менее чувствительна к размеру выборки, чем наблюдаемая гетерозиготность [30].

Для оценки генетических взаимоотношений между изученными образцами были вычислены показатели ожидаемой гетерозиготности и средняя гетерозиготность образцов. В данном исследовании максимальные значения H_E и H_{AVR} составили 0.49 и 0.00113 соответственно, выяв-

ленные праймером UBC 809. В соответствии с данными можно заключить, что изученные популяции инбредные и между выбранными образцами идет переопыление.

Показатели MI (Marker index) и E (Effective multiplex ratio) результатов нашего исследования варьировали от 1.76 до 5.23 и от 4.72 до 13.1, в среднем составили 2.81 и 7.35 соответственно. Максимальные значения индекса MI и EMR выявлены праймером HB 10, что показывает его информативность; минимальные значения – праймерами UBC 809 и GR 212 соответственно.

Для всех проанализированных ампликонов разрешающая способность R составляла 3.7–9.7, в среднем – 7.17. Наименьшее значение R установлено праймером UBC 809, наибольшее – MAO. Маркерные системы являются молекулярно-генетическим инструментом, способным устанавливать различия между множеством генотипов. R применяется для оценки дискриминационной способности молекулярных систем для большинства видов растений. В настоящей работе установлена корреляционная связь R с числом амплифицированных и полиморфных фрагментов.

На основе параметров, определяющих меру информативности маркеров, полученные результаты указывают на высокий молекулярно-генетический полиморфизм изученных образцов и подтверждают перспективность использова-

ния ISSR-PCR маркеров для установления генетических различий внутри вида. Использование ISSR-PCR маркеров отечественных исследователей [31] для изучения генетического разноо-

бразия образцов листьев яблони Сиверса также показали хороший результат и подтвердили эффективность применения межмикросателлитных маркеров.

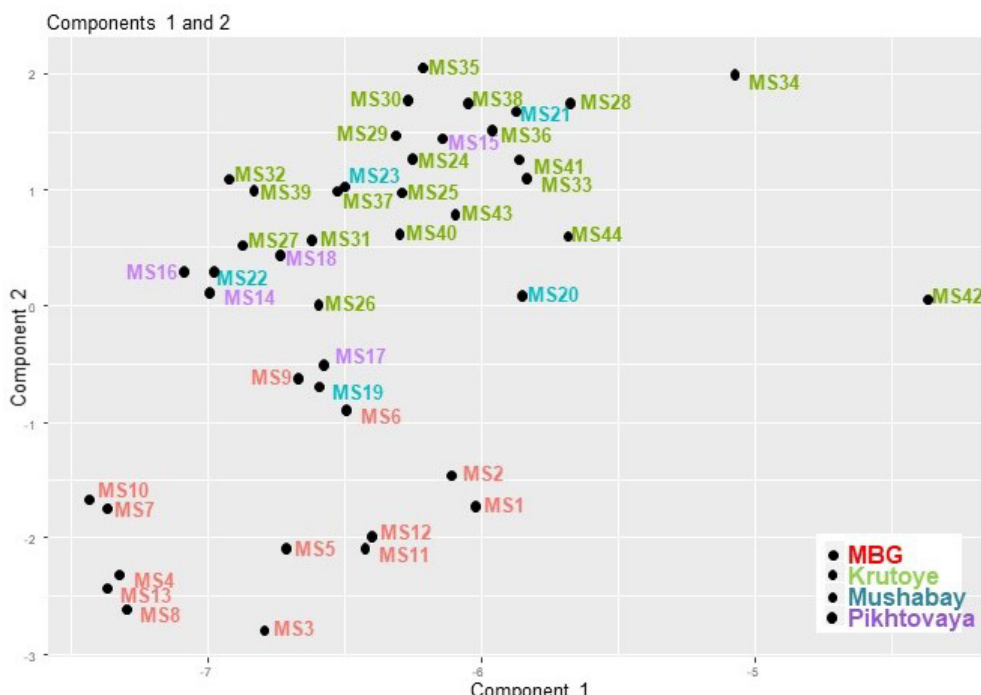


Рисунок 3 – Распределение изученных образцов с помощью анализа главных координат (PCA)

Анализ главных координат (PCA – Principal component analysis) для 44 образцов яблони Сиверса на основе ISSR матрицы показал, что 2 образца, произрастающие близко к проезжей части в популяции «Крутое» Джунгарского Алатау отделились от общего облака (Ms34 и Ms42), все остальные изученные образцы образуют более-менее неразорванное облако, в котором все сорто-клоны группируются вместе. Согласно PCA анализу образцы из природных популяций частично перемешаны, что указывает на генетический обмен между этими популяциями (Рис. 3). Аналогичные результаты были получены Омашевой и др. при использовании SSR маркеров [32], что подтверждает вероятную гибридизацию в природных популяциях дикой яблони с культурными сортами в зависимости от высоты расположения данной популяции.

Заключение

В результате изучения генетического разнообразия интродуцированных сортов-клонов

и природных форм яблони Сиверса Джунгарской популяции с использованием молекулярных маркеров выявлено, что изученные образцы отличаются широким диапазоном вариабельности как *in situ*, так и *ex situ*, что объясняется их биолого-экологическими особенностями. В результате использования 8 ISSR-PCR маркеров выявлен высокий уровень молекулярно-генетического полиморфизма внутри вида *M. sieversii*, констатирующий об информативности использованных маркеров в данном исследовании. Значение PIC, идентифицирующее дискриминационную способность маркера и эквивалентное разнообразию гена варьировало от 0.37 до 0.4 и в среднем составило 0.38. Наибольшее значение индекса выявлено для маркера HB10. Установлена корреляционная связь разрешающей способности маркера (R – resolving power) с числом амплифицированных и полиморфных фрагментов.

Дендрограмма, построенная с помощью PCA анализа показала, что все изученные сорто-клоны *M. sieversii* имеют генотип, аналогичный

формам из природных популяций Джунгарского Алатау, свидетельствующий об общем их географическом происхождении, но также выявляе-
но неравномерное генетическое распределение изученных образцов, указывающее на искусственную конструкцию генотипа сорто-клонов.

Литература

- 1 Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connor PA, Ries SM, Goffreda S, Voordeckers A (1992) Breeding apple for scab resistance. *Acta Hort* 317: 43-70
- 2 Вавилов Н.И. (1931a) Дикие родичи плодовых деревьев азиатской части СССР и Кавказа и проблема происхождения плодовых деревьев // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. Т. 26. вып. 3. С. 132-134.
- 3 Dzhangaliev, A.D. (2003) The wild apple tree of Kazakhstan. *Hort. Rev.* 29: 65–304.
- 4 Luby, J.; Forsline, P.; Aldwinckle, H.; Bus, V.; Geibel, M. (2001) Silk road apples—Collection, evaluation, and utilization of *Malus sieversii* from Central Asia. *HortScience*. 36: 225–231.
- 5 Harris S. A., Robinson J. P., Juniper D. E. (2002) Genetic clues to the origin of the apple//Trend in genetic, Vol.18, №8. P. 426-430
- 6 Джангалиев А.Д. (1977) Дикая яблоня Казахстана. – Алма-Ата: Наука. 280 с.
- 7 Zhou Z. Q., Y.N. Li. (2000) The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genet Res Crop Evol.* 47:353–357. DOI: 10.1023/A:1008740819941
- 8 Robinson J. P., Harris S. A., Juniper B.E. (2001) Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution*. 226: 35-58. DOI:10.1007/s006060170072
- 9 Forsline P. L., Aldwinckle H. S., Dickson E. E., Hokanson S. C. (2003) Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples from central Asia. *Hort. Rev.* 29:1–61.
- 10 Juniper B. and D. J. Maberley. (2006) The story of the apple. Portland, (OR): Timber Press, Portland – 511P.
- 11 Флора Казахстана / под ред. Н.В. Павлова: в 9 т. (1956, 1958, 1960, 1961, 1961, 1963, 1964, 1965, 1966). – Алма-Ата: Наука.
- 12 ICN. (2018) Терланд, Нью-Джерси, Wiersema, JH, Барри, FR, Greuter, W., Хоксворт, DL, Herendeen, PS, Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K., Май, TW, McNeill, J., Монро, AM, Prado, J., Price, MJ & Smith, GF (eds.) Международный кодекс номенклатуры для водорослей, грибов и растений (Шэньчжэнь кодекс), принятый Девятнадцатый Международный ботанический конгресс Шэньчжэнь, Китай, июль 2017 года . *Regnum Vegetabile* 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books. <https://doi.org/10.12705/>.
- 13 Yan G., H. Long, W. Song, and R. Chen. (2008) Genetic polymorphism of *Malus sieversii* populations in Xinjiang, China. *Genet. Resources Crop Evol.* 55:171–181. DOI: 10.1007/s10722-007-9226-5
- 14 Cornille A., Gladieux P., Smulders M. J. M., Roldan-Ruiz I., Laurens F., Le Cam B., Nersesyan A., Clavel J., Olonova M., Feugey L., Gabrielyan I., Zhang X.-G., Tenaillon M. I., Giraud T. (2012) New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet.* 8: e1002703. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002703
- 15 Zhang H., M. Zhang, L. Wang. (2015) Genetic structure and historical demography of *Malus sieversii* in the Yili Valley and the western mountains of the Junggar Basin, Xinjiang, China. *J Arid Land.* 7(2): 264–271. DOI: 10.1007/s40333-014-0044-2
- 16 Джангалиев А.Д., Салова Т.Н. (2007) Уникальное и глобальное значение генофонда яблоневых лесов Казахстана // Доклады НАН РК. –№5. – С.41-47.
- 17 Куцев М. Г. 2009. Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF, ISSR. – Барнаул: Арктика, 2009. -164 с.
- 18 Binneck E., Nedel J.L., Dellagostin O. A. (2002) RAPD analysis on cultivar identification: a useful methodology? *Rev. Bras. Sem.* 24: 183-196
- 19 Zhang C, Chen X, He T, et al. (2007) Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 34: 947–955. DOI: 10.1016/S1673-8527(07) 60106-4
- 20 Volk G. M., Richards C.M., Henk A.D., Reilley A. A., Miller D. D., Forsline P. L. (2009) Novel diversity identified in a wild apple population from the Kyrgyz Republic. *Hort. Science* 44:516-518. DOI: 10.21273/HORTSCI.44.2.516
- 21 Ситпаева Г.Т., Веселова П.В., Гемеджиева Н.Г., Грудзинская Л.М. и др. (2014) Комплексные исследования диких сородичей культурных растений Западного Тянь-Шаня // Тр. Инст. Ботаники и фитоинтродукции. – Алматы-194 с.
- 22 Omasheva M., Flachowsky H., Ryabushkina N., Pozharskiy A., Galiakparov N., Hanke M. (2017) To what extent do wild apples in Kazakhstan retain their genetic integrity? *Tree Genetics & Genomes*.13: 52. DOI: 10.1007/s11295-017-1134-z
- 23 Volk G. M., Richards C. M., Reilley A. A., Henk A.D., Forsline P.L., Aldwinckle H.S. (2005) Ex situ conservation of vegetatively propagated species: Development of a seedbased core collection for *Malus sieversii*.
a. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 203–210. DOI: 10.21273/JASHS.130.2.203
- 24 Richards C.M., Volk G.M., A.A. Reilley, A.D. Henk, D. Lockwood, P.A. Reeves, and P.L. Forsline. (2009b) Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet. Genomes* 5: 339–347. DOI: 10.1007/s11295-008-0190-9
- 25 Gupta M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson & J. L. Owen. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998–1006. DOI: 10.1007/BF00224530.

- 26 Фризен Н. (2007) Молекулярные методы, используемые в систематике растений. – Барнаул: АзБука, 2007. – С.33-34).
- 27 White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00224530>
- 28 Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32(3): 314–331.
- 29 Amiryousefi A, Hyyvönen J, Poczaí P. (2018) iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences.* 6(6): e1159. DOI:10.1002/aps3.1159.
- 30 Чесноков Ю.В. Артемьева А.М. (2015) Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия. *Сельскохозяйственная биология. Том 50, №5, с. 571-578.* doi:10.15389/agrobiology.2015.5.571rus
- 31 Бахтаулова А.С., Бекманов Б., Канагатов Ж.Ж. (2017) Молекулярно-генетический анализ разнообразия дикой яблони (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) с помощью ДНК-маркеров. *Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология. Медицина. География».* №4(88). – С. 21-28.
- 32 Omasheva M., Pozharsky A. S., Smailov B. B., Ryabushkina N. A., Galiakparov N. N. (2018) Genetic Diversity of Apple Cultivars Growing in Kazakhstan. *Russian Journal of Genetics, Vol. 54, No. 2, pp.176–187.*

References

- 1 Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connor PA, Ries SM, Goffreda S, Voordeckers A (1992) Breeding apple for scab resistance. *Acta Hort* 317: 43-70
- 2 Vavilov N. I. (1931b) *Dikie rodichi plodovoyh derevev // Tr. po prikl. botan., genet. i selektsii.* [The wild relatives of fruit trees of the Asian part of the USSR and Caucasus and the problem of the origin of fruit trees]. *Trans. Apple Bot. Gene Breed* 26(3):132–134.
- 3 Dzhangaliev, A.D. (2003) The wild apple tree of Kazakhstan. *Hort. Rev.* 29: 65–304.
- 4 Luby, J.; Forsline, P.; Aldwinckle, H.; Bus, V.; Geibel, M. (2001) Silk road apples—Collection, evaluation, and utilization of *Malus sieversii* from Central Asia. *HortScience.* 36: 225–231.
- 5 Harris S. A., Robinson J. P., Juniper D. E. (2002) Genetic clues to the origin of the apple//*Trend in genetic, Vol.18, №8. P. 426-430*
- 6 Dzhangaliev A. D. (1977) *Dikaja jablonja Kazahstana* [The wild apple of Kazakstan]. Nauka. Alma-Ata, 280 pp.
- 7 Zhou Z. Q., Y.N. Li. (2000) The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genet Res Crop Evol.* 47:353–357. DOI: 10.1023/A:1008740819941
- 8 Robinson J. P., Harris S. A., Juniper B.E. (2001) Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution.* 226: 35-58. DOI:10.1007/s006060170072
- 9 Forsline P. L., Aldwinckle H. S., Dickson E. E., Hokanson S. C. (2003) Collection, maintenance, haracterization, and utilization of wild apples from central Asia. *Hort. Rev.* 29:1–61.
- 10 Juniper B. and D. J. Mabberley. (2006) *The story of the apple.* Timber Press, Portland, (OR).
- 11 *Flora Kazakhstana / pod red. Pavlov N.V. (1956-1966)* [The Flora of Kazakhstan]. Alma-Ata, Nauka, T. 1-9. Alma-Ata, Science.
- 12 ICN. (2018) Turland, N. J., Wiersema, J. H., Barrie, F. R., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Kusber, W.-H., Li, D.-Z., Marhold, K., May, T. W., McNeill, J., Monro, A. M., Prado, J., Price, M. J. & Smith, G. F. (eds.) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017. *Regnum Vegetabile* 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books. DOI <https://doi.org/10.12705/Code.2018>
- 13 Yan G., H. Long, W. Song, and R. Chen. (2008) Genetic polymorphism of *Malus sieversii* populations in Xinjiang, China. *Genet. Resources Crop Evol.* 55:171–181. DOI: 10.1007/s10722-007-9226-5
- 14 Cornille A., Gladieux P., Smulders M. J. M., Roldan-Ruiz I., Laurens F., Le Cam B., Nersesyan A., Clavel J., Olonova M., Feugey L., Gabrielyan I., Zhang X.-G., Tenaillon M. I., Giraud T. (2012) New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet.* 8: e1002703. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002703
- 15 Zhang H., M. Zhang, L. Wang. (2015) Genetic structure and historical demography of *Malus sieversii* in the Yili Valley and the western mountains of the Junggar Basin, Xinjiang, China. *J Arid Land.* 7(2): 264–271. DOI: 10.1007/s40333-014-0044-2
- 16 Dzhangaliev A. D., Salova T. N. (2007) *Unikalnoe i globalnoe znachenie genofonda yablonevyh lesov Kazakhstana // Doklady NAN RK.* [Unique and global knowledge of the apple forest genefund of Kazakhstan // Reports of RK NAS]. 5: 41-47.
- 17 Kutsev M. G. (2009) *Fragmentnyi analiz DNK rastenii: RAPD, DAF, ISSR.* [Fragment analysis of plant DNA: RAPD, DAF, ISSR]. Arctika, Barnaul, 164 pp.
- 18 Binneck E., Nedel J.L., Dellagostin O. A. (2002) RAPD analysis on cultivar identification: a useful methodology? *Rev. Bras. Sem.* 24: 183-196
- 19 Zhang C, Chen X, He T, et al. (2007) Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics,* 34: 947–955. DOI: 10.1016/S1673-8527(07)60106-4
- 20 Volk G. M., Richards C.M., Henk A.D., Reilley A. A., Miller D. D., Forsline P. L. (2009) Novel diversity identified in a wild apple population from the Kyrgyz Republic. *Hort. Science* 44:516-518. DOI: 10.21273/HORTSCI.44.2.516

- 21 Sitpaeva G.T., Veselova P.V., Gemedjjeva N.G., Grudzinskaya L.M. et al. (2014) Kompleksnyye issledovaniya dikih sorodichei kulturnyh rastenii Zapadnogo Tyan-Shanya // Tr. inst. Botaniki i phitointroduksii. [Comprehensive studies of wild relatives of cultivated plants of the Western Tien Shan // Works of the Institute of Botany and Phytointroduction, Almaty, pp. 194]. Almaty, 194pp.
- 22 Omasheva M., Flachowsky H., Ryabushkina N., Pozharskiy A., Galiakparov N., Hanke M. (2017) To what extent do wild apples in Kazakhstan retain their genetic integrity? *Tree Genetics & Genomes*. 13: 52. DOI: 10.1007/s11295-017-1134-z
- 23 Volk G. M., Richards C. M., Reilley A. A., Henk A.D., Forsline P.L., Aldwinckle H.S. (2005) Ex situ conservation of vegetatively propagated species: Development of a seedbased core collection for *Malus sieversii*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 203–210. DOI: 10.21273/JASHS.130.2.203
- 24 Richards C.M., Volk G.M., A.A. Reilley, A.D. Henk, D. Lockwood, P.A. Reeves, and P.L. Forsline. (2009b) Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. *Tree Genet. Genomes* 5: 339–347. DOI: 10.1007/s11295-008-0190-9
- 25 Gupta M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson & J. L. Owen. (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 89: 998–1006. DOI: 10.1007/BF00224530
- 26 Friesen N. (2007) Molekuljarnye metody ispolzuemye v sistematike rastenii. [Molecular methods using in Plant taxonomy]. *Azbuka, Barnaul*, 33-34 pp.
- 27 White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00224530>
- 28 Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32(3): 314–331.
- 29 Amiryousefi A, Hyvönen J, Poczai P. (2018) iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*. 6(6): e1159. DOI:10.1002/aps3.1159
- 30 Chesnokov Yu.B., Artemyeva A.M. (2015) Otsenka mery informatsionnogo polimorfizma geneticheskogo raznoobrazia [Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]* 50(5): 571-578. doi:10.15389/agrobiolgy.
- 31 Bahtaulova A.S., Bekmanov B., Kanagatov Zh. Zh. (2017) Molekuljarno-geneticheskii analiz raznoobrazija dikoi jabloni (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) s pomoshh'u DNK-markerov. *Vestnik Karagandinskogo universiteta. Seriya "Biologiya. Meditsina. Geografija"* [Molecular-genetic analysis of the wild apple tree (*Malus sieversii* Ledeb. M. Roem.) diversity based on DNA-markers] *Vestnik of KarGU.* 4(88): 21-28.
- 32 Omasheva M., Pozharskiy A. S., Smailov B. B., Ryabushkina N. A., Galiakparov N. N. (2018) Genetic Diversity of Apple Cultivars Growing in Kazakhstan. *Russian Journal of Genetics*, Vol. 54, No. 2, pp.176–187.

2-бөлім
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 2
BIOTECHNOLOGY

Раздел 2
БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Л.С. Абеуова^{1,2}, Б.Р. Қали^{1,2}, А.О. Рахимжанова¹,
С.С. Беккужина¹, Ш.А. Манабаева^{1,2}**

¹Национальный центр биотехнологии КН МОН РК, Казахстан, г. Нур-Султан

²Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Нур-Султан,
e-mail: laura.ols91@mail.ru, manabayeva@biocenter.kz

ОСОБЕННОСТИ ПРЯМОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

В мировом производстве продукции растениеводства картофель занимает четвертое место после пшеницы, риса и кукурузы. В связи с пищевой ценностью данной культуры необходимо применять современные методы биотехнологии, в частности, редактирования генома данной культуры. В связи с чем эффективная система прямой регенерации *in vitro* является важным этапом для дальнейшего успешного использования данной технологии.

В результате экспериментов подобраны оптимальные питательные среды для получения прямой регенерации из отечественных сортов. Из восьми вариантов сред с различными комбинациями и концентрациями фитогормонов выявлена наиболее эффективная среда, содержащая 1,0 мг/л зеатина, 7 мг/л гибберелловой кислоты и 0,1 мг/л ИУК. Из всех сортов получены растения-регенеранты. Наибольшей регенерационной способностью обладали стеблевые экспланты по сравнению с листовыми. Количество микропобегов из одного экспланта варьировало от 1 до 25 в зависимости от сорта и варианта питательной среды для прямой регенерации. Таким образом, сорта картофеля казахстанской селекции обладали более высокой способностью к прямому органогенезу, образуя множество побегов на один эксплант.

Ключевые слова: прямая регенерация, картофель, отечественные сорта, регенерант, *in vitro*.

L.S. Abeuova^{1,2}, B.R. Kali^{1,2}, A.O. Rakhimzhanova¹,
S.S. Bekkuzhina¹, Sh.A. Manabayeva^{1,2}

¹National center for biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan

²L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Nur-Sultan,
e-mail: laura.ols91@mail.ru, manabayeva@biocenter.kz

Direct regeneration features of local potato cultivars *in vitro* culture

Potatoes are in fourth place in global crop production, after wheat, rice and corn. In connection with the nutritional value of this crop it is necessary to apply modern methods of biotechnology, in particular, editing the genome of this crop. For this, an effective system of *in vitro* direct regeneration is an important step for further successful use of this technology.

As a result of experiments, optimal culture media have been selected to obtain direct regeneration from local potato cultivars. The most effective medium containing 1.0 mg/l zeatin, 7 mg/l gibberellic acid and 0.1 mg/l IAA was identified from eight media variants with different combinations and concentrations of phytohormones. Regenerate plants were obtained from all varieties. Stem explants had the highest regenerative capacity as compared to leaf explants. The number of micro shoots from one explant varied from 1 to 25 depending on the variety and variant of culture medium for direct regeneration. Thus, the Kazakh potato cultivars possessed higher ability to direct organogenesis, forming many shoots on one explant.

Key words: direct regeneration, potato, domestic cultivars, regenerant, *in vitro*.

Л.С. Абеуова^{1,2}, Б.Р. Қали^{1,2}, А.Ө. Рахимжанова¹,
С.С. Беккужина¹, Ш.А. Манабаева^{1,2}

¹Ұлттық биотехнология орталығы ҒК БҒМ ҚР, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.

²Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ.,
e-mail: laura.ols91@mail.ru, manabayeva@biocenter.kz

Отандық картоп сұрыптарының *in vitro* культурасындағы тікелей регенерация ерекшеліктері

Дүниежүзілік өсімдік шаруашылығы өндірісінде картоп бидай, күріш және жүгеріден кейін төртінші орынды алады. Картоп дақылы аса жоғары тағамдық құндылыққа ие болғандықтан, биотехнологияның заманауи әдістерін, атап айтқанда, картоп геномын редактірлеуді талап етеді. Сондықтан, *in vitro* тікелей регенерацияның тиімді жүйесі осы технологияны одан әрі сәтті қолдану үшін маңызды қадам болып табылады.

Тәжірибелер нәтижесінде отандық сұрыптардан тікелей регенерация үшін оңтайлы қоректік орта таңдалды. Фитогормондардың әртүрлі комбинациясы мен концентрациясы бар ортаның сегіз нұсқасының ішінен 1,0 мг/л зеатин, 7 мг/л гиббереллин қышқылы және 0,1 мг/л индолилсірке қышқылы бар ең тиімді орта анықталды. Регенерантты өсімдіктер барлық сұрыптардан алынды. Регенерациялық жиілік жапырақ экспланттарымен салыстырғанда сабақтарда жоғары көрсеткішті көрсетті. Тура регенерациялауға арналған қоректік ортаның нұсқасына және сұрыптарға байланысты бір экспланттағы кіші өркендер саны 1-ден 25-ке дейін өзгерді. Осыған орай, отандық селекция сұрыптарының тікелей органогенезге жоғары қабілеттілігі анықталды.

Түйін сөздер: тікелей регенерация, картоп, отандық сұрыптар, регенерант, *in vitro*.

Введение

Картофель принадлежит к числу важнейших сельскохозяйственных культур. В мировом производстве продукции растениеводства картофель занимает четвертое место, после пшеницы, риса и кукурузы [1]. Среднее потребление картофеля на душу населения в Казахстане составляет 120–130 кг в год на человека, т.е. картофель для казахстанцев по-прежнему является «вторым хлебом». В настоящее время картофель в нашей стране возделывается на площади 180–190 тыс.га, урожайность картофеля в среднем по республике составляет 161,8 ц/га. Прогнозный валовой сбор картофеля в среднем составляет порядка 3,7 млн тонн в год [2]. Используется как важнейшая продовольственная, техническая и кормовая культура, также на картофелепродукты, основными из которых являются чипсы, картофель-фри, пюре и другие. На долю которой приходится около 20% посевных площадей в мире и примерно 15% мировой продукции [3, 4].

С помощью современных методов генетической инженерии можно создать новые формы растений, улучшая ценные признаки и агрономические качества, которые ограничены генетическими особенностями данного вида. Важным условием использования методов генетической инженерии растений в селекционных программах служит разработка простых и эффективных методов регенерации растений из культивируе-

мых *in vitro* тканей и клеток. Известно, что технологии *in vitro* и методы генетической инженерии растений имеют ряд преимуществ перед традиционными методами селекции. Однако есть немало сложностей при индукции морфогенеза у картофеля в культуре *in vitro*, которые определяются генетическими особенностями сорта, возрастом растения, выбором экспланта, компонентами питательной среды, соотношением ростовых гормонов и условиями культивирования. В связи с выше сказанным является важным моментом изучение особенностей каллусогенеза и регенерации различных генотипов картофеля в зависимости от типа выбранного экспланта, состава питательной среды и фитогормонов. Регенерационная способность растений зависит от многих факторов: от состава питательной среды, подбора оптимальных соотношений регуляторов роста (цитокинины и ауксины); от типа экспланта (стеблевые, листовые, корневые) а также от источника углеводов. При этом генотип картофеля является решающим фактором успеха в культуре *in vitro*. У сортов культурного вида картофеля *S. tuberosum* L. получены растения-регенеранты практически из всех органов: из черешков листа [5], листовых пластинок [6], стеблевых эксплантов [7], клубневых дисков [8], протопластов [9, 10].

Конечная цель данных экспериментальных исследований является разработка технологии редактирования генома для коммерческих от-

еественных сортов картофеля, где определение наиболее оптимального способа регенерации побегов из разных эксплантов решает эффективность поставленных задач.

Таким образом, в данной статье обсуждается регенерационная способность эксплантов разных сортов картофеля.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований использовали четыре сорта картофеля отечественной селекции – Астаналык, Памятник Кунаева, Тохтар и Аксор. Сорт Аксор – выведен в Казахском НИИ картофелеводства и овощеводства. Получен методом ступенчатой, внутривидовой гибридизации. Включен в Государственный реестр селекционных достижений РК в 1998г. Сорт Тохтар – среднеранний, высокоурожайный, с высокой полевой устойчивостью к вирусным и грибным болезням. Относительно жаростоек и засухоустойчив. Сорт Астаналык – соматоклон сорта Карасайский, высокоустойчив к сухой фузариозной гнили и вирусным болезням. Сорта Тохтар и Аксор – устойчивые к вирусным болезням и

жарким почвенноклиматическим условиям, районированы в Южном Казахстане.

В качестве базовой питательной среды для прямой регенерации картофеля использовали среду Мурасиге-Скуга [11] и МСВ (МС соли с витаминами МС). Для культуры вегетативных органов картофеля использованы ауксины, такие как β-индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), α-нафтил-1-уксусная кислота (НУК); цитокинины, такие как кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), зеатин и гибберелловая кислота в различных концентрациях и комбинациях. В качестве источника углеводов использовали сахарозу – 20 и 30 г/л.

В наших экспериментах варианты питательных сред для прямой регенерации (ПР) обозначили от I до VIII. Варианты экспериментов по повышению эффективности регенерации картофеля, изученные на 8 вариантах питательных сред на основе МС с витаминами и комбинациями фитогормонов зеатина (0,5 мг/л, 1,0 мг/л и 2,0 мг/л), гибберелловой кислоты (0,1 мг/л, 1,0 мг/л, 3,0 мг/л, 5,0 мг/л, 7,0 мг/л), БАП (1,0 мг/л и 2,0 мг/л), НУК (0,05 мг/л, 0,1 и 0,2 мг/л) и ИУК 0,1 мг/л показаны в таблице 1.

Таблица 1 – Комбинации фитогормонов в питательной среде МС для индукции прямой регенерации

МС +	ПР-I	ПР-I	ПР-III	ПР-IV	ПР-V	ПР-VI	ПР-VII	ПР-VIII
Зеатин	0,5	1,0	2			2,0	2,0	1,0
ГКЗ	3,0	5,0	7	1,0	1,0	0,1	0,1	7,0
6-БАП				1,0	2,0			
НУК	0,5	0,1	0,2			0,1		
ИУК							0,1	0,1

Примечание: МС+ – среда Мурасиге-Скуга с витаминами МС, ПР – Прямая регенерация, ГКЗ – гибберелловая кислота, 6-БАП – 6-бензиламинопурин, НУК – α-нафтил-1-уксусная кислота, ИУК – β-индолил-3-уксусной кислоты.

Эксперименты по культивированию картофеля проводили по общепринятой методике [12]. Питательные среды предварительно автоклавировали («MELAtronic 23 EN», Германия) в течение 40 мин (давление – 1,0 атм, температура – 121°C) доводили pH питательной среды до значения 5,6 – 5,8 с помощью 1 М NaOH. Регуляторы роста и витамины стерилизовали фильтрованием с помощью фильтрующих насадок («ГРР», Швейцария, диаметр пор 0,22 мкм) и добавляли в остывшую среду. Сегменты листьев и стеблей культивировали на агаризованной питательной среде МС, содержащей различные комбинации и концентрации ростовых регуляторов. В качестве

источника желирующего агента использовали фитогель в количестве 2 г/л. Экспланты культивировали в асептических условиях на свету при температуре 26-28°C и 16-часовом фотопериоде. Стебли и листья разрезали, делая поранения со всех сторон, затем пораненной стороной раскладывали на чашки Петри по вариантам сред, и через каждые две недели ткани пассировали. Побегообразующие экспланты пересаживали в широкие пробирки с крышками, затем в мадженты-боксы в асептических условиях.

Полученные результаты исследований анализировали, используя компьютерную программу Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Известно, что подбор питательной среды является одним из важных элементов повышения частоты выхода морфогенных структур и регенерации. Для культивирования растений *in vitro* создавали специальные условия с целью получения целого растения из эксплантов картофеля. Необходимым компонентом питательной среды являются витамины и фитогормоны – соединения, которые участвуют в регуляции физиологических процессов у растений. Известны три класса фитогормонов, действующих преимущественно как стимуляторы роста, это – ауксины, цитокинины и гиббереллины. Фитогормоны в культуре изолированных тканей необходимы для дедифференцировки клеток и индукции клеточных делений. Согласно теории гормональной регуляции, направление морфогенеза контролируется соотношением концентрации экзогенных фитогормонов в среде, в основном ауксинов и цитокининов. Высокое содержание цитокининов по отношению к ауксинам способствует образованию побегов. Например, добавление в питательную среду зеатина является наиболее эффективным для прямой регенерации [13]. Известны определенная роль гибберелловой кислоты.

По результатам экспериментальных данных выявлено, что использованные питательные среды индуцировали побегообразование, но при этом необходимо отметить сортовую специфику ответа отзывчивости на условия культивирования. Результаты показали, что стеблевые экспланты всех сортов индуцировали побеги на всех испытываемых средах, отличающиеся различными комбинациями и концентрациями ростовых веществ. В данной серии экспериментов определена эффективная среда для прямой регенерации побегов, как ПР-VIII с добавлением 0,1 мг / л IAA, 1,0 мг / л зеатина и 7,0 мг / л ГКЗ, где сорт Астаналык дал наибольшую индукцию побегов (90,0%) из стеблевых эксплантов, затем Аксор (87,5%) и Тохтар (70,0%). Кроме того, на данной среде листовые экспланты сортов Аксор и Тохтар дали лучшие результаты, индуцируя 67,5% и 30,0% побегов (рисунок 1). Наши результаты согласуются с данными литературных источников, где продемонстрировано, что GA3 является одним из важных растительных гормонов, обладающих способностью вызывать ряд ответных

реакций растений, включая прямую регенерацию побегов [14, 15], а также известно, что сочетание ауксинов и цитокининов в присутствии GA3 усиливает регенерацию побегов [16, 17].

Интересно отметить и результаты, полученные при сочетании гормонов НУК, зеатин и ГКЗ в различных концентрациях, в частности, на средах ПР-I, II и III стеблевые экспланты всех изучаемых сортов проявили способность к побегообразованию. Ранее сообщалось, что среда с комбинацией гормонов БАП и ГКЗ вызывает побегообразование с частотой 94,1% у сорта картофеля Kufri Jyoti [18]. Однако, в наших экспериментах данные комбинации фитогормонов дали не самые лучшие результаты, например, у сортов Памятник Кунаева и Астаналык.

Таким образом, для прямой регенерации побегов из отечественных сортов картофеля комбинации фитогормонов зеатин и ГКЗ с ИУК и НУК оказались более эффективными, чем комбинация БАП и ГКЗ.

При визуальной оценке побегообразующей способности эксплантов картофеля также наблюдали сортовые различия. Например, сорта Тохтар и Аксор формировали плотные, твердые каллусы зелено-коричневого цвета с обеих сторон стеблевых и листовых эксплантов после 12-13 дней первого пассажа (рисунок 2 – б и г). У сортов Астаналык и Памятник Кунаева наблюдались рыхлые каллусы желто-зеленого цвета у стеблевых эксплантов на 17-24 день (рисунок 2 – а и в).

Известно, что существуют генотипические различия картофеля по частоте образования микропобегов. Результаты наших экспериментов показывают, что данный показатель зависит от типов экспланта. Стеблевые экспланты образовывали микропобеги большей степени чем листовые экспланты, но в то же время сорт Аксор проявил способность к прямой регенерации как из стеблевых, так и из листовых эксплантов (рисунок 3).

Из всех сортов получены растений-регенеранты. Количество микропобегов из одного экспланта варьировала от 1 до 25 в зависимости от сорта и варианта питательной среды для прямой регенерации. Сорта Аксор, Тохтар и Астаналык обладали более высокой способностью к прямому органогенезу, образуя множество побегов на один эксплант. (таблица 2).

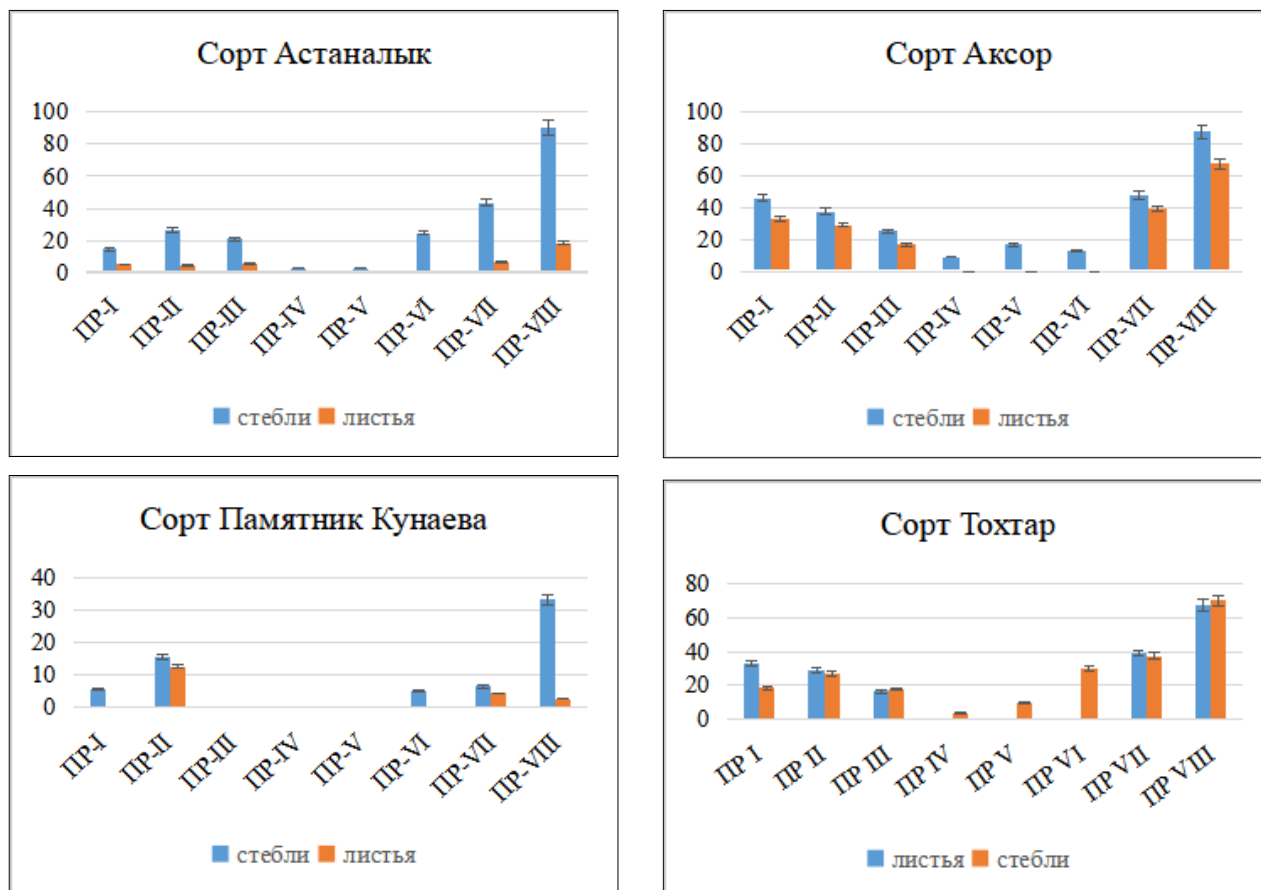


Рисунок 1 – Частота регенерации стеблевых и листовых эксплантов у отечественных сортов картофеля на разных вариантах сред (%); А – сорт Астаналык, Б – сорт Аксор, В – сорт Тохтар и Г – сорт Памятник Кунаева



Рисунок 2 – Процесс образования микропобегов на стеблевых эксплантах картофеля: а – Памятник Кунаева, б – Аксор, в – Астаналык, г – Тохтар.

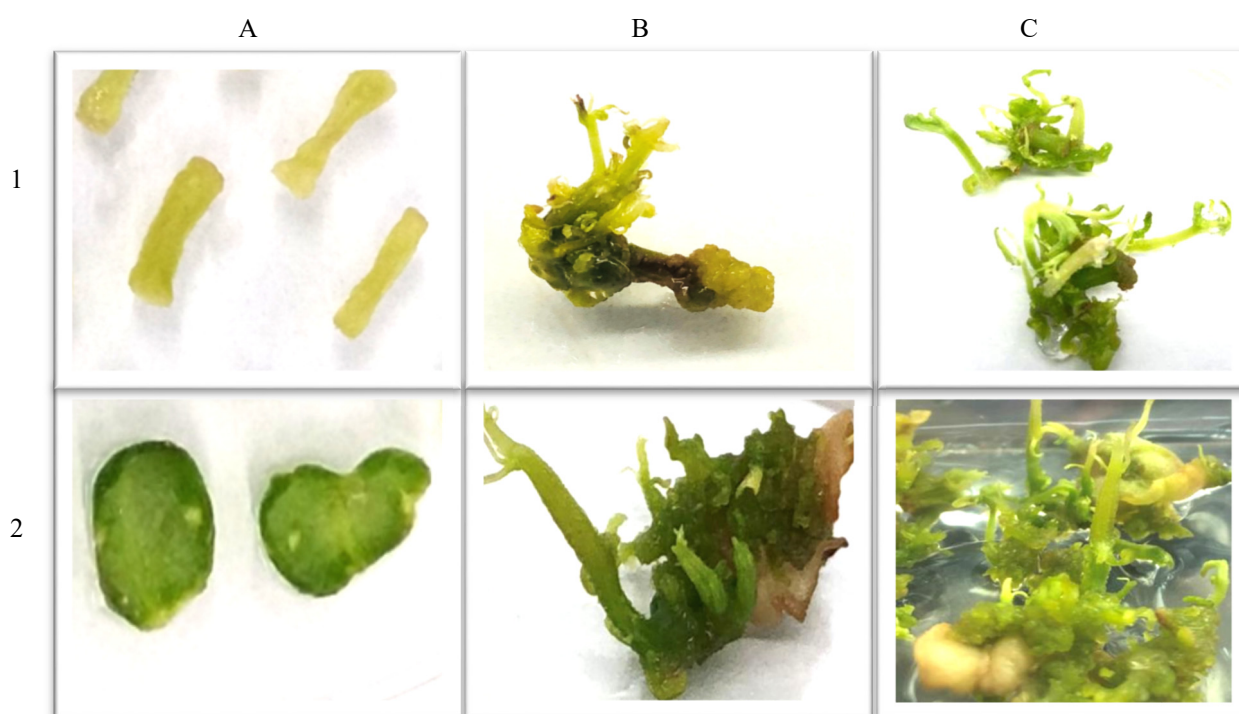


Рисунок 3 – Прямая регенерация разных эксплантов картофеля сорта Аксор:
 1 – прямая регенерация из сегментов стебля. 2 – прямая регенерация из листьев.
 А – 2-х недельные экспланты; В – 4- недельные экспланты;
 С – 6-недельные экспланты с микропобегами

Таблица 2 – Среднее число побегов (шт) на один эксплантов картофеля отечественных сортов на разных питательных средах

Вариант питательной среды	Сорт/тип эксплантов							
	Аксор		Астаналык		Тохтар		Памятник Кунаева	
	стебл.	лист.	стебл.	лист.	стебл.	лист.	стебл.	лист.
ПР-I	6,45±1,45	6,2±1,36	4,3±1,13	2,5±0,43	5,8±1,63	4,0±1,44	1,0±0,2	0,0±0,0
ПР-II	5,1±0,65	3,33±1,51	2,5±0,44	1,5±0,06	6,25±1,56	2,3±1,07	1,0±0,3	1,0±0,21
ПР-III	6,4±1,35	4,75±1,25	3,5±1,02	2,7±0,98	3,5±1,51	3,33±1,1	0	0
ПР-IV	8,3±1,72	0	4,5±1,3	0	1,0±0,03	0	0	0
ПР-V	6,5±1,32	0	2,0±0,26	0	9,0±1,41	0	0	0
ПР-VI	4,85±1,43	0	3,0±1,33	0	6,0±1,70	1,5±0,71	1,0±0,2	0
ПР-VII	5,5±2,05	4,3±0,92	2,2±0,78	2,0±0,34	5,5±1,16	4,5±1,62	2,0±1,1	1,5±0,9
ПР-VIII	10,0±2,91	8,0±1,98	6,2±1,43	2,5±0,91	9,0±2,14	6,0±1,72	3,0±1,4	2,5±1,02

И так, показатели прямой регенерации варьировали от 1 до 10 побегов на эксплант, при этом наилучший результат достигнут на среде ПР-VIII, содержащей IAA, зеатин и ГКЗ в концентрациях 0,1, 1,0 и 7,0 мг/л соответственно.

Заключение

В данной статье проведен поиск эффективных культуральных условий, включая подбор комбинации и концентрации различных ростовых регуляторов, также типов экспланта для прямой регенерации картофеля.

Стеблевые эксплантаты показали более высокий регенерационный потенциал, чем листовые экспланты. Сорт Астаналык отличился способностью индуцировать побеги из стеблевых эксплантов (90,0%). Несмотря на то что многочисленные результаты исследования акцентируют внимание на высокие способности

стеблевых эксплантов индуцировать прямой органогенез, необходимо отметить важность индуцирования процесса регенерации из листовых эксплантов. Эффективность получения растений-регенерантов из листовых эксплантов имеет актуальность при получении регенератов из протопластов. Регенерация растений из протопластов снижает риск множества проявлений соматической изменчивости. Полученные нами данные, подтверждающие возможность индукции прямой регенерации из листовых эксплантов является положительным результатом проведенных экспериментальных исследований.



Таким образом, отбор высокоэффективных сортов в культуре *in vitro* и оптимизирование условий культивирования будут использоваться для применения новой технологии геномного редактирования для улучшения хозяйственно-ценных признаков культуры картофеля.

Литература

- 1 Программа по развитию АПК в РК на 2013 – 2020 г. «Агробизнес– 2020». – Астана, 2012.
- 2 <https://inbusiness.kz/ru/last/pereproizvodstvo-kartofelya-zhdet-kazahstan>
- 3 Шпаар Д. Картофель // Торжок. ООО «ЛВД Агродело». – 2010. – С. 474.
- 4 Граскова И. А., Кузнецов Е.В., Живетьев М.А., Чекуров В.М., Войников В.К. Детекция влияния обработки аналогами препарата «Силк» растений картофеля в полевых условиях // *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. – 2009. – Т. 5, № 1-2. – С. 39-44.
- 5 Yee S., Stevens B., Coleman S., Seabrook JEA, Li X.Q. High efficiency regeneration *in vitro* from potato petioles with intact leaflets // *Am J Potato Res.* – 2001. – Vol 78. – P. 151–157.
- 6 Yadav NR, Sticklen MB. Direct and efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje // *Plant Cell Reports.* – 1995. – Vol. 14. – P. 645-647.
- 7 Kaur A.M., Reddy S., Kumar A. Efficient, one step and cultivar independent shoot organogenesis of potato // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2017. – Vol. 23. – P. 461-469.
- 8 Javier Narváez-Vásquez, Clarence A Ryan. The system in precursor gene regulates both defensive and developmental genes in *Solanum tuberosum* // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2002. – Vol. 23-99, No. 24. – P.15818-15821.
- 9 Ehsanpour A.A., Michael G.K. Jones. Evaluation of direct shoot regeneration from stem explants of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Delaware by Thidiazuron (TDZ) // *J. Sci. Tech. Agric.* – 2000. – Vol. 3. – P. 47-54.
- 10 Craig W., Gargano D., Scotti N., Nguyen T.T. Direct gene transfer in potato: A comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts // *Plant Cell Reports.* – 2006. – Vol. 24, No. 10. – P. 603-611.
- 11 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* – 1962. – Vol. 15, No. 3. – P. 473–497.
- 12 Першина Л.А. Основные методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений: учебное пособие. Изд. 2-е, перераб. и доп. – Новосибирск. – 2005. – Т. 138, № 4. – С. 138.
- 13 Turhan, H. Callus induction and growth in transgenic potato genotypes // *African Journal of Biotechnology.* – 2004. – Vol.3. – P. 375-378.
- 14 Roest S., Bokelmann G.S. Vegetative propagation of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* // *Potato Research.* – 1976. – Vol. 19. – P. 173-178.
- 15 Ibragimova S.M., Romanova A.V., Myzgina G.K., Kochetov A.V. The morphogenic potential of Siberian Potato Cultivars in tissue cultures // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* – 2018. – Vol. 22, No.3. – P. 316-320.
- 16 Campos N.A., Silva G.J., Paula M.F.Bd., Rodrigues T.B. A direct organogenesis protocol from shoot segments of *Solanum tuberosum* cv. Monalisa // *Australian Journal of Crop Science.* – 2016. – Vol. 10, No. 07. – P. 964-968.
- 17 Kumlay A.M. Combination of the auxins NAA, IBA, and IAA with GA3 improves the commercial seed-tuber production of potato (*Solanum tuberosum* L.) under *in vitro* conditions // *Biomed Res Int.* – 2014. – Vol. 2014, No. 439259.
- 18 Tara S.R., Krishnaprasad B.T., Anil. V.S. Direct and Indirect Regeneration of Potato Cultivar Kufri Jyoti // *Journal of Biotechnology and Biochemistry.* – 2017. – Vol. 3, No. 4. – P. 31-34.

References

- 1 Programma po razvitiyu APK v RK na 2013 – 2020 g (2012) [Agro-industrial complex development program in the Republic of Kazakhstan for 2013 – 2020]. «Agrobiznes– 2020».
- 2 <https://inbusiness.kz/ru/last/pereproizvodstvo-kartofelya-zhdet-kazahstan>
- 3 Shpaar D. (2010) Kartofel' [Potato]. Torzhok. OOO «LVD Agrodelo», pp. 474.
- 4 Graskova I. A., Kuznetsov E.V., Zhivet'ev M.A., Chekurov V.M., Voinikov V.K. (2009) Detektsiya vliyaniya obrabotki analogami preparata «Silk» rastenii kartofelya v polevykh usloviyakh [Detection of the influence of processing potato plants in the field by analogues of the Silk preparation]. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, vol. 5, no 1-2, pp. 39–44.
- 5 Yee S, Stevens B, Coleman S, Seabrook JEA, Li XQ (2001) High efficiency regeneration in vitro from potato petioles with intact leaflets. *Am J Potato Res.*, vol. 78, pp. 151–157.
- 6 Yadav NR, Sticklen MB (1995) Direct and efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje. *Plant Cell Reports*, vol. 14, pp. 645-647.
- 7 Kaur A.M., Reddy S., Kumar A. (2017) Efficient, one step and cultivar independent shoot organogenesis of potato. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, vol. 23, pp. 461-469.
- 8 Javier Narváez-Vásquez, Clarence A Ryan (2002) The system in precursor gene regulates both defensive and developmental genes in *Solanum tuberosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 99, no 24, pp. 15818-21.
- 9 Ehsanpour A.A., Michael G.K. Jones (2000) Evaluation of direct shoot regeneration from stem explants of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Delaware by Thidiazuron (TDZ). *J. Sci. Tech. Agric.*, vol. 3, pp. 47-54.
- 10 Craig W, Gargano D, Scotti N, T T Nguyen (2006) Direct gene transfer in potato: A comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Cell Reports*, vol. 24, no 10, pp. 603-11.
- 11 Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, vol 15, no 3, pp. 473–497.
- 12 Pershina L.A. (2005) Osnovnye metody kul'tivirovaniya in vitro v biotekhnologii rastenii: uchebnoe posobie [Basic in vitro cultivation methods in plant biotechnology: a training manual], vol. 138, no 4, pp. 138.
- 13 Turhan, H. (2004) Callus induction and growth in transgenic potato genotypes. *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, pp. 375-378.
- 14 Roest S., Bokelmann G.S. (1976) Vegetative propagation of *Solanum tuberosum* L. in vitro // *Potato Research*, vol. 19, pp. 173-178.
- 15 Ibragimova SM, Romanova AV, Myzgina GK, Kochetov AV. (2018) The Morphogenic Potential of Siberian Potato Cultivars in Tissue Cultures. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, vol. 22, no 3, pp. 316-320.
- 16 Campos N.A., Silva G.J., Paula M.F.Bd., Rodrigues T.B. (2016) A direct organogenesis protocol from shoot segments of *Solanum tuberosum* cv. Monalisa. *Australian Journal of Crop Science*, vol. 10, no. 07, pp. 964-968.
- 17 Kumlay A.M. (2014) Combination of the auxins NAA, IBA, and IAA with GA3 improves the commercial seed-tuber production of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro conditions. *Biomed Res Int.*, vol. 2014, no. 439259.
- 18 Tara S.R., Krishnaprasad B.T., Anil. V.S. (2017) Direct and Indirect Regeneration of Potato Cultivar Kufri Jyoti. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, vol. 3, no. 4, pp. 31-34.

G.Zh. Abdieva¹ , P.S. Ualieva¹ , A.M. Malik¹ ,
A.T. Artmann² , N.Sh. Akimbekov¹ 

¹ Al-Farabi Kazakh National University, Department of Biotechnology,
Kazakhstan, Almaty, e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

² University of Applied Sciences F.H. Aachen Institute of Bioengineering (IfB), Germany, Aachen

SELECTION OF POPS DEGRADING MICROORGANISMS AND THEIR MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION

Currently, one of the environmentally friendly problems is the contamination of the natural environment, which is resistant to low-pollutants, possesses a high toxicity. Pesticides, including chlorine-based coefficients, are particularly suitable for environmental and human use. Toxic substances from repositories for pesticides can cause a serious threat to all living organisms. Most of the studies conducted are devoted to studying the effect of pesticides on microbial populations in the soils of agrocenoses, while the study of soil microbial complexes in pesticide burial areas has not been adequately addressed. At the same time, microorganisms isolated from ecosystems exposed to prolonged exposure to pesticides have the potential to decompose these compounds more quickly, which makes it necessary to study the microbial communities of soils contaminated with pesticides, both for assessing biological risk and for selecting promising destructor microorganisms for bioremediation technologies of natural objects.

In connection with the above purpose of this study, a screening of prospective microorganisms – POP destructors and molecular genetic identification of the selected strains was performed.

Soil samples were taken from 4 points (v. Kyzylkayrat, v. Amangeldy №1, v. Amangeldy №2, v. Brigada-2 – Almaty Plemzavod, v. Bashy (control) of the Talgar territory the area of Almaty region adjacent to the pesticide burial sites. As a result of studies, strains of microorganisms destructors with destructive activity against persistent organic pollutants were selected. These strains can be used to create a biological product, to clean up soil contaminated with chlorine pesticides.

Key words: organochlorine pesticides, microbial diversity, screening, destructive microorganisms, identification, chemical pollutants.

Г.Ж. Абдиева¹, П.С. Уалиева¹, А.М. Мәлік¹, А.Т. Артманн², Н.Ш. Акимбеков¹

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, биотехнология кафедрасы,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

²Ф.Х. Аахен атындағы қолданбалы ғылым университеті,
Биоинженерия институты (IfB), Германия, Аахен қ.

Тұрақты органикалық қосылыстарды ыдыратушы микроорганизм – деструкторларды іріктеу және молекулалық-генетикалық идентификациясы

Қазіргі таңда өзекті экологиялық проблемалардың бірі табиғи объектілердің токсинділігі жоғары тұрақты органикалық қосылыстармен ластануы болып табылады. Пестицидтердің ішінде, хлорорганикалық қосылыстар қоршаған орта мен адам үшін аса қауіптілігімен ерекшеленеді. Пестицидтерге арналған қоймалардың токсинді заттары барлық тірі организмдер үшін үлкен қауіп төндіруі мүмкін. Жүргізілген зерттеу жұмыстарының көп бөлігі агроценоз топырағындағы пестицидтердің микробтық алуантүрлілігін зерттеуге арналған, ал пестицидтер көмілген жерлерде топырақ микробиоценозын зерттеу тиісті деңгейде қарастырылмаған. Сонымен қатар ұзақ уақыт пестицидтер әсеріне ұшыраған экожүйелерден оқшауланған микроорганизмдер пестицидтерді ыдырату қабілетіне ие болғандықтан, пестицидтермен ластанған топырақтың микробтық алуантүрлілігін зерттеуді қажет етеді, биологиялық қауіпті бағалау және перспективті деструктор – микроорганизмдерді таңдау табиғи объектілерді биоремедиациялау технологияларын ұйымдастыруға мүмкіндік береді.

Жоғарыда айтылған мәселені шешуге байланысты зерттеудің мақсаты іріктеліп алынған перспективті деструктор-микроорганизмдерінің скринингін жүргізу және молекулалық-генетикалық идентификациясы.

Топырақ үлгілерінің сынамалары 4 аймақтан (Қызылқайрат, Амангелді №1, Амангелді №2, Бригада-2 – «Алматы» Племзавод, Басшы аумақтарынан (бақылау) алынды. Зерттеулер нәтижелеріне сәйкес тұрақты органикалық ластағыштарға төзімді деструктивті белсенділігі жоғары, деструктор-микроорганизм штамдары іріктеліп алынды. Бұл штамдар хлорорганикалық пестицидтермен ластанған топырақты тазалау процесінде биопрепарат жасауда қолданылуы мүмкін.

Түйін сөздер: хлорорганикалық пестицидтер, микробтық алуантүрлілік, скрининг, деструктор-микроорганизмдер, идентификация, химиялық ластағыштар.

Г.Ж. Абдиева¹, П.С. Уалиева¹, А.М. Мәлік¹, А.Т. Артманн², Н.Ш. Акимбеков¹

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, кафедра биотехнологии, Казахстан, г. Алматы, e-mail: azhar.malikkyzy@gmail.com

²Университет прикладных наук им. Ф.Х. Аахена, Институт биоинженерии (IfB), Германия, г. Аахен

Отбор микроорганизмов-деструкторов стойких органических загрязнителей и их молекулярно-генетическая идентификация

В настоящее время одной из экологических проблем является загрязнение природных экосистем стойкими органическими загрязнителями, обладающими высокой токсичностью. Пестициды, в том числе хлорорганические соединения, представляют особую опасность для окружающей среды и человека. Токсичные вещества из хранилищ для пестицидов могут вызвать серьезную угрозу для всех живых организмов. Большинство проводимых исследований посвящено изучению влияния пестицидов на популяции микроорганизмов в почвах агроценозов, тогда как вопросы изучения почвенных микробных комплексов в районах захоронения пестицидов освещены недостаточно. В то же время микроорганизмы, выделенные из экосистем, подвергающихся длительному воздействию пестицидов, обладают потенциалом к более быстрому разложению данных соединений, что делает необходимым изучение микробных сообществ почв, загрязненных пестицидами, как для оценки биологического риска, так и для отбора перспективных деструкторов – микроорганизмов для технологии биоремедиации природных объектов.

В связи с вышесказанным целью данного исследования был скрининг перспективных микроорганизмов – деструкторов СОЗ и проведение молекулярно-генетической идентификации отобранных штаммов.

Пробы почвенных образцов отбирали из 4 точек (п. Кызылқайрат, п. Амангельды №1, п. Амангельды №2, п. Бригада-2 – АО Племзавод «Алматы», п. Басшы (контроль) территории Талгарского района Алматинской области, прилегающей к местам захоронения пестицидов. В результате исследований были отобраны штаммы микроорганизмы-деструкторы, обладающие деструктивной активностью в отношении стойких органических загрязнителей. Эти штаммы могут быть использованы для создания биопрепарата для очистки почвы, загрязненной хлорорганическими пестицидами.

Ключевые слова: хлорорганические пестициды, микробное разнообразие, скрининг, микроорганизмы-деструкторы, идентификация, химические загрязнители.

Introduction

Currently, the Republic of Kazakhstan is facing an acute environmental problem related to the consequences of the long-term use of pesticides in agriculture – chemicals for controlling pests of agricultural plants.

As you know, at present their use is practically prohibited, but due to their high toxicity with respect to biological objects of soils and water bodies, another problem arose, the leveling of which is associated with the need to create new environmentally hazardous facilities – storages (warehouses) for huge quantities of unused pesticides – substances highly dangerous to all living organisms [1]. The

construction of such storage facilities was dictated by the fact that in recent years the use of these drugs, due to a noticeable decrease in demand for them, has decreased markedly. The reason for this strategy was the following factors: low efficiency and negative impact on environmental objects [2].

However, given the possibility of the successful development of new tools to mitigate the negative effects of pesticides on organisms that inhabit objects of the environment – soil, water and air, their intended use in the future is not excluded, but, on the contrary, may become necessary [3].

Based on the foregoing, in some regions special storage facilities have been built for pesticides available in warehouses. In particular,

they are available in the Talgar district of the Almaty region.

Although, as is known, all the studies carried out earlier in this direction were devoted to studying the target activity of pesticides in the process of their application in agriculture, at present, the problems associated with the influence of pesticide storages on the ecology. The environment on the physiological activity of microorganisms also require attention and other living objects of water and soil, which in such studies can serve as markers of changes, which are based on the presence of pesticides and their decomposition products in environmental objects yes [4].

It is important that their metabolic activity can assess the intensity and nature of the effects of toxic substances, for example pesticides, on metabolic processes in the cells of soil microorganisms directly, i.e. metabolic potential of soil microbial communities in pesticide burial areas [5].

Such studies, on the one hand, will provide reliable information not only about the impact of pesticide storages on the environmental situation of the studied region, but also have prognostic value, because allow us to judge the possible changes in the microbial potential in environmental objects in the presence of significant amounts of pesticides in storage [6]. It is equally important that the study of microbial communities of soils contaminated with pesticides is necessary both for assessing biological risk and for selecting promising agents for remediation activities in contaminated areas [7].

Materials and research methods

The study of the study of microbial specimens of soil samples of the Almaty region, which is in contact with places of contamination of pesticides is carried out. Soil samples were taken from 4 points (v. Kyzylkayrat, v. Amangeldy №1, v. Amangeldy №2, v. Brigada-2 – Almaty Plemzavod, v. Bashi (control) of the Talgar territory the area of Almaty region adjacent to the pesticide burial sites.

Methods of screening POPs degrading microorganisms of chemical contaminants and methods for the determination of destructive activity of selected positive stamps.

To search for destructors, we used strains from dominant populations of bacteria. For this, all isolated strains were seeded on Petri dishes with M9 agar medium supplemented with a pesticide as a carbon source of 0.01%, 2,3,5 – triphenyl tetrazolium chloride (TTC) as an indicator of bacterial dehydrogenase activity [8]. The ability

of microorganisms to disinfect pesticides shows the color of them from the medium in red, which indicates the appearance of triphenyl form. For these features of microorganisms, strain-destructors were selected for further research [9].

Molecular – genetic identification of distinguished POPs degrading microorganisms.

Strain identification was performed by determining the nucleotide sequence of the 16s rRNA fragment of the gene, followed by determining the nucleotide identity with sequences deposited in the international Gene Bank database. Phylogenetic trees with nucleotide sequences of reference strains were constructed [10].

Results and Discussion

Screening of POPs degrading microorganisms and their degradation products

One of the urgent tasks of modern biotechnology is the creation of biological products based on strains of destructors isolated from indigenous microflora to solve a complex of tasks related to the rehabilitation of soils contaminated with xenobiotics [11]. Soils are exposed to especially severe destructive effects due to the intensive use of pesticides in violation of the norms and rules of their use, which leads to their significant accumulation in soils [12]. Of particular danger are landfills for unused or prohibited chemicals. Natural processes of soil self-purification are not able to cope with such volumes of pollution [13,14].

It is known that soil fertility and self-cleaning directly depend on the activity of microbiological processes, however, as a result of high soil intoxication, autochthonous microflora is inhibited [15]. Therefore, the development of integrated technologies aimed at restoring the basic functions of soils and increasing their fertility is of considerable scientific interest, both for theoretical and applied microbiology. Currently, methods of biological remediation are considered as priorities for solving the problems of cleaning contaminated soils [16, 17].

Biodegradation is considered the most promising area in the technologies for the rehabilitation of soil systems infected with organic pollutants, including pesticides.

In connection with the above, the goal of further research was to screen effective destructive microorganisms, study the destructive potential of cultures and select the most promising strains. The search for destructors was carried out among cultures from the dominant populations of microorganisms

[18]. Destruction strains in the total soil microbiota were indicated on solid M9 medium with the addition of DDT pesticide as a carbon source of 0.01%, 2,3,5 – triphenyl tetrazolium chloride (TTC) as an indicator of bacterial dehydrogenase activity [19]. Destructive activity of cultures was evaluated by the activity of growth and preservation of cell viability in the presence of organochlorine compounds. Screening of active microorganisms- destructors of POPs and their decay products was carried out in all 40 strains of pure cultures isolated from soil and water adjacent to the burial sites of pesticides. According to screening studies, 10 strains did not show growth in a medium supplemented with DDT as the sole carbon source. The lack of growth of cultures indicates that the strains do not have destructive activity. 20 strains showed the least activity against pesticide. The strains *K2*, *K3*, *AK3*, *AK4*, *AK 5*, *AC1*, *BR1*, *BR3*, *BR7* isolated from the burial site of pesticides, have a high destructive activity against DDT.

There is data in the literature that shows that the use of a wide range of pesticides suggests different

mechanisms of action of these substances on prokaryotic and eukaryotic cells of microorganisms, on heterotrophic microorganisms, and the spectrum of these mechanisms is very wide [20]. Derivatives of carbamates are known to affect cell division; organic copper compounds and dithiocarbamates – for membrane permeability and oxidative phosphorylation, electron transfer in the respiratory chain; organic mercury compounds react with cellular components, reacting with carboxylic, sulfhydryl, amino groups, metal ions [21]. Therefore, strains of isolated pure cultures showed different growth activities in the medium with the organochlorine preparation DDT.

As a result of screening among 20 destructively active strains, we selected 4 promising cultures of microorganisms that can actively grow on a medium with the organochlorine compound DDT for further work. The results are presented in figures 1, 2.

Figure 1 shows the growth dynamics of cultures of promising strains in the medium with the addition of DDT as the sole carbon source.

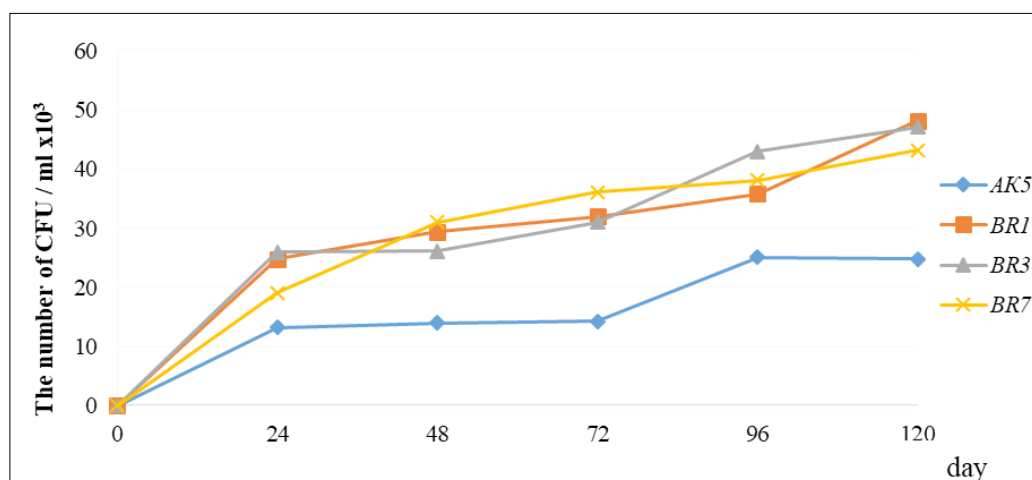


Figure 1 – The growth dynamics of crops in the environment with the addition of DDT as the sole carbon source

Among the studied strains, the highest growth activity was shown by strains *AK5*, *BR1*, *BR3*, *BR7*. The growth of strain *BR7* on the first day of cultivation showed active growth, the number of cells in the medium was 2.9×10^4 CFU / g. The abundance of all cultures at the end of the experiment was within 2.4×10^4 – 4.8×10^4 CFU /

g (Fig. 1). Active growth of cultures in a medium with the addition of DDT show that the strains use organochlorine compounds as the sole carbon source.

Figure 2 shows the growth of cultures of microorganisms – destructors on the environment with the addition of DDT.

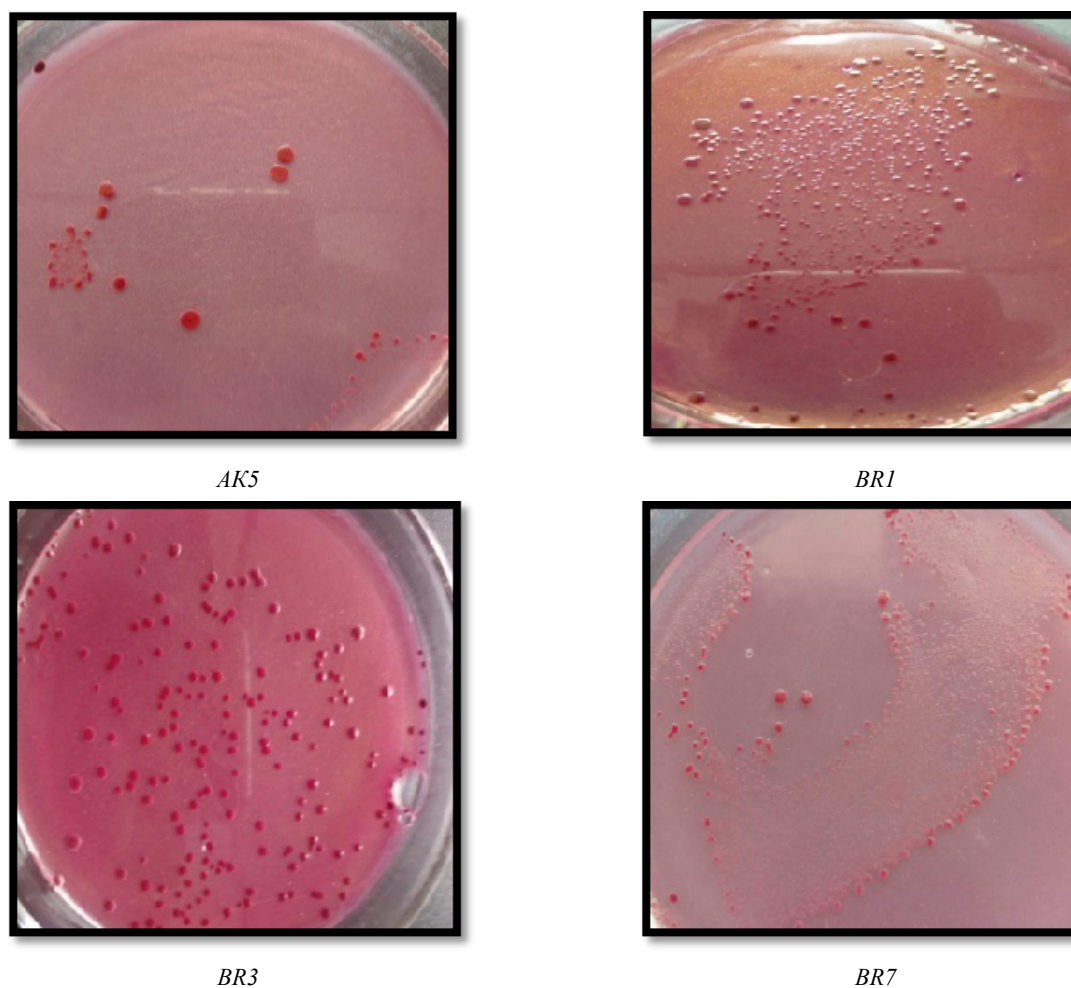


Figure 2 – Macromorphology of cultures of microorganisms – destructors on the environment with the addition of DDT

I would like to note that on the dense M9 medium all the colonies were only smooth, shiny S – red. Cultures on M9 medium in addition to DDT, as the only carbon source, change the initial white – matte color to red, this is due to the formation of reduced triphenylformazan (TPP) in the medium, which indicates the dehydrogenase activity of the microorganism. The scientific literature provides numerous examples of the transformation of various pesticides under the influence of microorganisms in certain conditions and certain soils [22]. So, for example, organochlorine preparations (DDT) under the influence of microflora undergo deep decomposition with the splitting of aromatic rings.

As a result of studying the destructive activity of promising strains of chemical pollutants, it was found that strains *AK5*, *BR1*, *BR3*, *BR7* are capable of destroying pesticides, this was indicated by

the staining of the colonies and the environment around them in red, indicating the formation of reduced triphenylformazan (TFP). Since, under aerobic conditions, the first stage of xenobiotic biodegradation is oxidative metabolism reactions catalyzed by various oxidoreductases, the main of which are dehydrogenases, the identification of these enzymes in microorganisms indicates the destructive potential of the culture [23].

In future work, it was planned to conduct an analysis on the molecular genetic identification of selected strains of destructors *AK5*, *BR1*, *BR3*, *BR7*.

Molecular genetic identification of isolated strains of POPs degrading microorganisms.

AK5, *BR1*, *BR3*, *BR7* strains can be recommended for the creation of a comprehensive product designed to clean land contaminated with organochlorine pesticides.

Selected cultures were identified to species. Molecular genetic identification of microorganisms was carried out by Sanger sequencing [26]. A fragment of the 16S rRNA gene, about 700 bp in size, was amplified by PCR. The nucleotide sequences and identification results are presented in table 1.

Table 1 – Results of identification by analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene

№	The name of the strain	The sequence of the 16S r RNA gene fragment	Identification of nucleotide sequences in the international database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) BLAST algorithm		
			GenBank Inventory Number (Accession number)	The name of the strain	% coincide
1	AK5	2	3	4	5
1	AK5	GTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACG CATTTCACCGCTACACGTGGAATCCACTCTCCTCTT CTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCCTCCC GGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAA CCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGAC AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC ACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTC AAGGTACCGCCCTATTTCGAACGGTACTGTCTTCCC TAACAACAGAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCA CTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTG CGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT GGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCC CTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTGGTGAGCCG TTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT CTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGA ACCATGCGGTTCAAACAAGCATCCGGTATTAGCCCC GGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTT ACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCCGCTAACATCAG GGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGATGT ATTAGGCACGCCGCC	<i>BGSC 3A28</i>	<i>Bacillus sub- tillis</i>	99%
2	BR1	AGTTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGACGGGTGA GTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATA ACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCT TCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCA TCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG GTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTC TGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT TGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC GTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT CAGCGAGGAGGAAGGGTAGTGTGTTAATAGCACATT GCATTGACGTTACTCGAGAAGAAGCACCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAA GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCA GGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGATATCCCCGCGCT TAACGTGGAACTGCATTTGATACTGGCAAGCTAGA GTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAATCCAGGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGG CGAAGGCGGCTCCCCTG	<i>NR 114575.1</i>	<i>Serratia quinivorans</i>	99%

Continuation of table 1

№	The name of the strain	The sequence of the 16S r RNA gene fragment	Identification of nucleotide sequences in the international database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) BLAST algorithm		
			GenBank Inventory Number (Accession number)	The name of the strain	% coincide
3	BR3	GGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTC TACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCC TCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTT CCCAGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGAC AGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCCGA TTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGG CACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTC AATTGCTGCGGTTATTAACCACAACACCTTCCTCCCC GCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATA CACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTG CAATATTCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGA CCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA GACCAGCTAGGGATCGTCGCTAGGTGAGCCGTTAC CCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGAT GGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTGGTCTTGC GACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTA TCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTCACC CGTCCGCCACTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCTCTGTG CTACCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCTGCCGCC	NR 118011.1	<i>Enterobacter cloacae subsp. dissolvens</i>	100%
4	BR7	TCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCACCAT CCTCTACCGCACTCTAGCTTGCCAGTATCGAATGCA ATCCCAGTTGAGCCCGGGGATTTACATCTGACTT ACAAGCCGCTACGCGCGCTTACGCCAGTAAAT CCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTG CTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCCAGTA ACGTC	NR 025254.1	<i>Alkanindiges illinoisensis</i>	95%

Taking into account the literature data [24], indicating the presence of nucleotide sequences in international banks GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), errors, in addition, phylogenetic trees with 16S rRNA nucleotide sequences of the gene of reference strains of these species were constructed (<http://www.bacterio.net>).

The analysis included nucleotide sequences of the 16S rRNA gene, the most phylogenetically related microorganisms [25].

To construct a phylogenetic tree for strain AK5, the nucleotide sequences of 16S rRNA reference strains included in the *Bacillus subtilis* group were used [27].

Figure 3 shows the phylogenetic analysis of genetically related species of *Bacillus mojavensis* and *Bacillus subtilis*.

As can be seen from figure 4, strain BR1 is located on the same branch as *Serratia plymuthica* and *Serratia quinivorans*, given the high identity of 16S rRNA in these species.

As can be seen from figure 5, strain BR3 is located on the same branch as *Enterobacter ludwigi* and *Enterobacter cloacae subsp. dissolvens* given the high identity of 16S rRNA in these species.

Figure 6 shows the phylogenetic analysis of genetically related species *Alkanindiges hongkongensis* and *Alkanindiges illinoisensis*.

As a result of molecular genetic identification of the selected cultures of microorganisms, strain AK5 was assigned to the species *Bacillus subtilis*, BR1 – *Serratia quinivorans*, BR3 – *Enterobacter cloacae subsp. dissolvens*, BR7 – *Alkanindiges illinoisensis*.

Thus, the studies indicate the need for continuous monitoring of the state of microbial diversity in the area adjacent to the burial sites of pesticides, as well as studying the possibility of using microorganisms as indicators of environmental pollution. The search and identification of promising cultures of microorganisms among bacteria, micromycetes, capable of actively degrading persistent organic pollutants, is the basis in the development of bioremediation measures to clean the soil of residual pesticides.

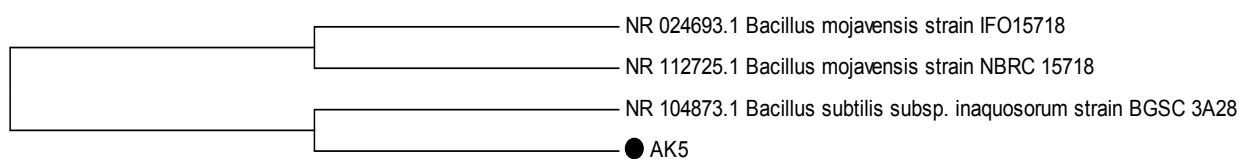


Figure 3 – Phylogenetic tree, built on the basis of analysis of the 16S rRNA gene fragment of *Bacillus subtilis*

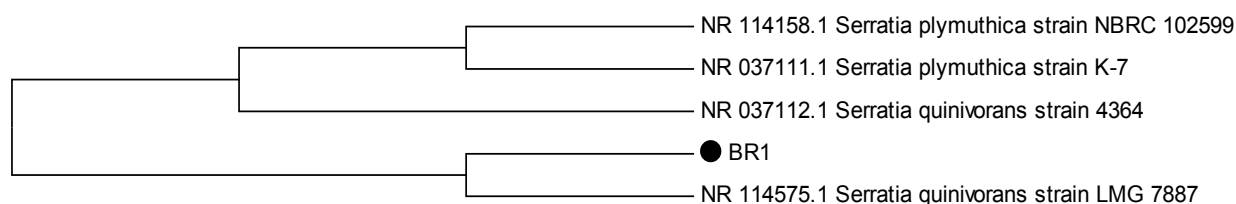


Figure 4 – Phylogenetic tree, built on the basis of analysis of the 16S rRNA gene fragment of *Serratia quinivorans*



Figure 5 – Phylogenetic tree, built on the basis of analysis of the 16S rRNA gene fragment of *Enterobacter cloacae subsp. dissolvens*

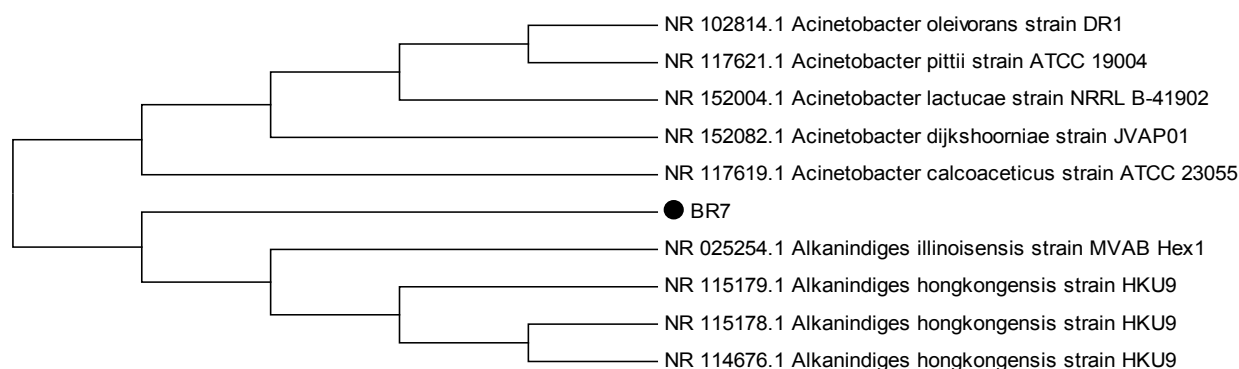


Figure 6 – Phylogenetic tree, built on the basis of analysis of the 16S rRNA gene fragment of *Alkanindiges illinoisensis*

Conclusion

As a result of screening, 4 promising strains of microorganism cultures were selected that can actively grow on a medium with the organochlorine compound DDT. The number of cells of the studied strains in a day amounted to 1.7×10^3 - 8.6×10^3 CFU / g, on the fifth day it was in the range of 2.1×10^4 - 1.2×10^4 CFU / g.

Among the studied strains, the highest growth activity was shown by strains AK5, BR1, BR3, BR7. The growth of strain BR7 on the first day of cultivation showed active growth, the number of cells in the medium was 2.9×10^4 CFU / g. The number of all cultures at the end of the experiment was in the range of 2.4×10^4 - 4.8×10^4 CFU / g. Active growth of cultures with the environment with the addition of DDT show that the strains use organochlorine compounds as the sole carbon source.

As a result of molecular genetic identification of the selected cultures of microorganisms, strain AK5 was assigned to the species *Bacillus subtilis*, BR1 – *Serratia quinivorans*, BR3 – *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*, BR7 – *Alkanindiges illinoisensis*.

The search and identification of promising cultures of microorganisms among bacteria, micromycetes, capable of actively degrading persistent organic pollutants, is the basis in the development of bioremediation measures to clean the soil of residual pesticides.

Conflict of interest. All authors have read and are familiar with the content of the article and do not have a conflict of interest.

Acknowledgements. This work was done in the framework of the project «Comprehensive assessment of the impact of unused and banned pesticides on the genetic status and health of the population of the Almaty region» in the Program «Determination of microbial diversity of environmental objects in the territory adjacent to places of pesticides disposal, screening of micro-organisms-destroyers of chemical pollutants» BR05236379 the Republic of Kazakhstan.

Funding. This research work was supported by the National Grant Program of Kazakhstan for 2018- 2020. Research project ID: BR05236379

References

- 1 Kulikova-Khlebnikova E.N., Robertus Yu.V., Kivatskaya A.V., Lyubimov R.V. Features of organochlorine pesticide contamination of environmental objects in the Altai Republic // Bulletin of the Altai State Agrarian University. – 2013. №. 106. – P. 59-63.
- 2 Abed, R.M.M., and Koster, J. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2005. – Vol. 55. №7. – P. 29–37.
- 3 Aislabie, J., Saul, D., and Foght, J. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils // Extremophiles. – 2006. – Vol. 10. №3. – P. 171–179.
- 4 Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., and Nies, L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR // Applied and Environmental Microbiology, – 2003. – Vol. 6, № 69. – P. 3350–3358.
- 5 Kolupaev A.V. Soil microorganisms-biodestructors of organic pesticides // Abstract of Diss. work. – 2010. №. 44. – P. 18-30.
- 6 Boonchan, S., Britz, M.L., and Stanley, G.A. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures // Applied Environment Microbiology, – 2000. – Vol. 3, № 66. – P. 1007–1019.
- 7 Boopathy, R. Factors limiting bioremediation technologies // Bioresource Technology, – 2000. – Vol. 74. № 5. – P. 63–67.
- 8 Feng Y., Minard R.D., Bollag J.-M. Photolytic and microbial degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol // Environ. Toxicol. and Chem. 1998. – Vol. 17, № 5. – P. 814–819.
- 9 Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M., Bottger E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA // Nucleic. Acids Res. – 2009. – Vol. 17. №28. – P. 7843–7853.
- 10 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // International Journal of Systematic Bacteriology. – 2005. – Vol. 45. №12. – P. 595–599.
- 11 Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I., and Siezen, R.J. Hydrocarbon-degrading bacteria: The oil-spill clean-up crew // Microbial Biotechnology, – 2009. – Vol. 6, № 2. – P. 587–594.
- 12 Brown, L.D., Cologgi, D.L., Gee, K.F., and Ulrich, A.C. Chapter 12–bioremediation of oil spills on land. In Fingas, M. (Ed.) // Oil Spill Science and Technology, 2nd ed. Boston, MA: Gulf Professional Publishing, – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. 699–729.
- 13 Michael R. Green and Joseph Sambrook. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents // Cold Spring Harb Protoc; – 2001, – doi: 10.1101/pdb.prot093450).
- 14 Eugenio N., Pennock A. Soil Pollution a hidden reality // Rome, FAO. – 2018. №3. – P. 142.
- 15 Vasnetsova E.V., Ksenofontova O. Yu., Tikhonova D.A., Filimonova E.A., Savina K.V. Search for strains-destroyers of pesticides prometryn, ghtsg and 4,4-ddt in the soil of the pesticide burial area in Saratov region // Izv. Sarat. un-that. New ser. Ser. Chemistry. Biology. Ecology. – 2016. – №16. – P. 3.

- 16 Tretyakova, S.E. Creation of a biological product based on the prometrin-destructive strain *Pseudomonas putida* P2 immobilized on microcapsules for remediation of prometrin-contaminated soils S.E. Tretyakova, O.Yu. Ksenofontova // Ecology: synthesis of natural science, technical and humanitarian knowledge: theses of dokl. III Vseros. scientific-practical forum. – Saratov: SSTU, – 2012. № 26. – P. 114-118.
- 17 Agranovich G.I. Handbook of physical and chemical studies of environmental objects. – L.: Shipbuilding, – 2003. № 25. – P. 648.
- 18 Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M., Camargo, F., Do-Carmo, R.P.M., and Bento, F.M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures // *Bioresource Technology*, – 2011. – Vol. 23, № 102. – P. 11003–11010.
- 19 Brusa T., Del Puppo E. Microbial. degradation of the sulfonylurea herbicides. Current knowledge, – 2005. – Vol. 45, № 2. – P. 321–330.
- 20 Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., and Sharma, A., Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon // *Annals of Microbiology*, – 2013. – Vol. 63. №18. – P. 417–431.
- 21 Domracheva L. I., T. Ashikhmina YA., Kondakova L. V., Berezin G. I. Theoretical problems of ecology. Soil microbiota response to pesticides (review) // *Theoretical and applied ecology*. – 2012. №3. – P. 4-16.
- 22 Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., and Joner, E.J. Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment // *Environmental Science and Pollution Research*, – 2005. – Vol. 1, № 12. – P. 34–48.
- 23 Costa, A.S., Romao, L.P., Araujo, B.R., Lucas, S.C., Maciel, S.T., Wisniewski Jr., A., and Alexandre, M.R. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass // *Bioresource Technology*, – 2012. – Vol. 105. № 26. – P. 31–39.
- 24 Clarridge III J. E.. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2004. – Vol. 17. № 3. – P. 840–862.
- 25 Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina, M.S., and Philp, J.C. Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol // *International Biodeterioration Biodegradation*, – 2004. – Vol. 54. № 27. – P. 167–174.
- 26 Nishimori E., Kita-Tsakamoto K., Wakabayashi H. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis* // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2000. – Vol. 1, № 15. – P. 9.
- 27 Shivaji S., Chaturvedi P., Suresh K., Reddy G.S., Dutt C.B., Wainwright M., Narlikar J.V., Bhargava P.M. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2006. – Vol. 7. № 33. – P. 1465-73.

References

- 1 Abed, R.M.M., and Koster, J. “The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 55, no.7 (2005): pp. 29–37.
- 2 Aislabie, J., Saul, D., and Foght, J. “Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils”. *Extremophiles*, vol. 10, no.3 (2006): pp. 171–179.
- 3 Agranovich G.I. “Spravochnik po fiziko-khimicheskim issledovaniyam ob"yektov okruzhayushchey sredy” [Handbook of physical and chemical studies of environmental objects]. L.: Sudostroyeniye, no. 25 (2003): pp. 648.
- 4 Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., and Nies, L. “Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 5, no 69 (2003): pp. 3350–3358.
- 5 Brusa T., Del Puppo E. “Microbial. degradation of the sulfonylurea herbicides”. *Current knowledge* 22, vol. 45, no 2 (2005): pp. 321-330.
- 6 Boonchan, S., Britz, M.L., and Stanley, G.A. “Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures”. *Applied Environment Microbiology*, vol. 3, no 66 (2000): pp. 1007–1019.
- 7 Boopathy, R. “Factors limiting bioremediation technologies”. *Bioresource Technology*, vol. 74, no. 5 (2000): pp. 63–67.
- 8 Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I., and Siezen, R.J. “Hydrocarbon-degrading bacteria: The oil-spill clean-up crew”. *Microbial Biotechnology*, vol. 6, no 2 (2009): pp. 587–594.
- 9 Brown, L.D., Cologgi, D.L., Gee, K.F., and Ulrich, A.C. “Chapter 12–bioremediation of oil spills on land. In Fingas, M. (Ed.)”. *Oil Spill Science and Technology*, 2nd ed. Boston, MA: Gulf Professional Publishing, vol. 12, no 2 (2017): pp. 699–729.
- 10 Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M., Camargo, F., Do-Carmo, R.P.M., and Bento, F.M. “Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures”. *Bioresource Technology*, vol. 23, no 102 (2011): pp. 11003–11010.
- 11 Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., and Sharma, A. “Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon”. *Annals of Microbiology*, vol. 63. no. 18 (2013): pp. 417–431.
- 12 Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., and Joner, E.J. “Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment”. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 1, no 12 (2005): pp. 34–48.
- 13 Clarridge III J. E. “Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases”. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 3 (2004): pp. 840–862.

- 14 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. "Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa". *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 45, no. 12 (2005): pp. 595–599.
- 15 Costa, A.S., Romao, L.P., Araujo, B.R., Lucas, S.C., Maciel, S.T., Wisniewski Jr., A., and Alexandre, M.R. "Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass". *Bioresource Technology*, vol. 105, no. 26 (2012): pp. 31–39.
- 16 Cunningham, C.J., Ivshina, I.B., Lozinsky, V.I., Kuyukina, M.S., and Philp, J.C. "Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol". *International Biodeterioration Biodegradation*, vol. 54, no. 27 (2004): pp. 167–174.
- 17 Domracheva L. I., T. Ashikhmina YA., Kondakova L. V., Berezin G. I. "Teoreticheskiye problemy ekologii. Reaktsiya pochvennoy mikrobioty na deystviye pestitsidov (obzor)" [Theoretical problems of ecology. Soil microbiota response to pesticides (review)]. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*, no. 3 (2012): pp. 4-16.
- 18 Feng, M. and Bollag, J. "Photolytic and microbial degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol". *Environ. Toxicol. and Chem.* vol. 42, no. 6, (2008): pp. 2334-2344.
- 19 Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M., Bottger E.C. "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA". *Nucleic. Acids Res.*, vol. 17, no. 28 (2009): pp. 7843–7853.
- 20 Eugenio N., Pennock A. "Soil Pollution a hidden reality". Rome, FAO, no. 3 (2018): pp. 142.
- 21 Kolupayev A.V. "Pochvennyye mikroorganizmy-biodestruktory organicheskikh pestitsidov" [Soil microorganisms-biodestructors of organic pesticides]. *Avtoreferat diss. Raboty*, no. 44 (2010): pp. 18-30.
- 22 Kulikova-Khlebnikova E.N., Robertus U.V., Kivatskaya A.V., Lyubimov R.V. "Kharakteristika zagryazneniya khlororganicheskimi pestitsidami obyektov okruzhayushchey sredy Respubliki Altay" [Characterization of organochlorine pesticides pollution of environmental objects of the Altai Republic]. *Vestnik Gosudarstvennogo agrarnogo universiteta Altay*, no. 106 (2013): pp. 59-63.
- 23 Michael R. Green and Joseph Sambrook. "Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents". *Cold Spring Harb Protoc*; – doi: 10.1101/pdb.prot093450 (2001).
- 24 Nishimori E., Kita-Tsukamoto K., Wakabayashi H. "Pseudomonas plecoglossicida sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*". *Int J Syst Evol Microbiol.*, vol. 1, no. 15 (2000): pp. 9.
- 25 Shivaji S., Chaturvedi P., Suresh K., Reddy G.S., Dutt C.B., Wainwright M., Narlikar J.V., Bhargava P.M. "Bacillus aerius sp. nov., Bacillus aerophilus sp. nov., Bacillus stratosphericus sp. nov. and Bacillus altitudinis sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes". *Int J Syst Evol Microbiol.*, vol. 7, no. 33 (2006): pp. 1465-73.
- 26 Tretyakova, S.E. "Sozdaniye biopreparata na osnove shtamma-destruktora prometrina Pseudo-monas putida P2, immobilizovannogo na mikro- kapsulakh, dlya remediatsii zagryaznennykh prometrinom pochv" [Creation of a biological product based on the prometrin-destructive strain Pseudo-monas putida P2 immobilized on microcapsules for remediation of prometrin-contaminated soils]. *Ekologiya: sintez yestestvennonauchnogo, tekhnicheskogo i gumanitarnogo znaniya: tezisy dokl. III Vseros. nauch.-prakt. foruma.* – Saratov: SGTU, no. 26 (2012): pp. 114-118.
- 27 Vasnetsova E.V., Ksenofontova O.U., Tikhonova D.A., Filimonova E.A., Savina K.V. "Poisk shtammov-destruktorov pestitsidov prometrina, gkhtsg i 4,4-ddt v pochve territorii zakhroneniya pestitsidov v saratovskoy oblasti" [Search for strains-destructors of pesticides prometrin, ghtsg and 4,4-ddt in the soil of the pesticide burial area in Saratov areas]. *Izv. Sarat. un-ta. Seriya Khimiya. Biologiya. Ekologiya*, no. 16 (2016): pp. 3.

Н.Р. Акмуханова , **А.К. Садвакасова** , **М.М. Төреханова** ,
М.Ө. Бауенова , **А. Адак** , **А. Карабекова** , **Б.К. Заядан** 

Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: asem182010@gmail.com

ВЛИЯНИЕ CHLORELLA VULGARIS Z-1 НА МИКРОБНЫЙ СОСТАВ РЫБОХОЗЯЙСТВЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД

В статье приведены результаты изучения влияния штамма зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris* Z-1 на санитарно-микробиологическое состояние сточной воды форелевого и осетрового пруда рыбного хозяйства в селе Саймасай. Сточная вода обоих прудов рыбного хозяйства характеризовалась высоким содержанием в них органо-минеральных веществ. По результатам проведения санитарно-бактериологических исследований ОМЧ воды в прудах составило $5,6-6,4 \times 10^5$ КОЕ/см³ вода, коли-индекс – 10, отмечается наличие аэромонад и псевдомонад. Установлено, что после культивирования микроводорослей *Chl vulgaris* Z-1 в сточных водах осетрового и форелевого пруда заметно улучшилась микробиологическая характеристика, общее микробное число уменьшилось на 70-75 %, коли-индекс – на 5, т.е. воду рыбного хозяйства по степени загрязненности можно признать чистой. При этом установлено, что в морфологическом составе микрофлоры обоих прудов наблюдается заметное уменьшение групп палочковидных микроорганизмов, увеличение содержания кокковидных бактерий и отсутствие аэромонад и псевдомонад. Выявлено изменение соотношения физиологических групп микроорганизмов в очищенной воде после культивирования микроводорослей. Так, заметно снижалась численность аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий, в то время как количество нитрифицирующих микроорганизмов значительно выросло, это связано с увеличением полуразложившихся органических веществ, вовлеченных в процесс аммонификации.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris* Z-1, ОМЧ (общее микробное число), санитарно-микробиологическое состояние, рыбохозяйственная сточная вода.

N.R. Akmukhanova, A.K. Sadvakasova, M.M. Torekhanova,
M.O. Bauyenova, A. Adak, A. Karabekova, B.K. Zayadan

Al-Farabi Kazakh National University,
Kazakhstan, Almaty, e-mail: asem182010@gmail.com

Influence of microalgae on the microbial composition of fishery wastewater

The article presents the results of a study that examined the effect of the green microalgae strain *Chlorella vulgaris* Z-1 on the sanitary-microbiological state of wastewater from trout and sturgeon ponds of the Saymasay fishery. The wastewater of both ponds of fisheries was characterized by a high content of organo-mineral substances. According to the results of sanitary-bacteriological studies, the total microbial number (TMN) of water in the ponds amounted to $5,6- 6,4 \times 10^5$ KOE / cm³ of water, at the water quality index of 10, and the presence of aeromonads and pseudomonads was also noted. It was found that after the cultivation of the microalgae *Chl vulgaris* Z-1 in the wastewater of the sturgeon and trout pond, the microbiological characteristic improved significantly, the TMN decreased by 70-75%, and the water of the Saymasay fishery, with index 5, considered to be clean by evaluating the degree of pollution. It was found in the morphological composition of the microflora of both ponds that there was a noticeable decrease in the groups of rod-shaped microorganisms, an increase in the content of cocciform bacteria and the absence of aeromonads and pseudomonads. A change in the ratio of physiological groups of microorganisms in purified water after microalgae cultivation was revealed. The number of ammonifying and denitrifying bacteria noticeably decreased, while the number of nitrifying microorganisms increased significantly, which indicates the content of semi-decomposed organic residues involved in the ammonification process.

Key words: *Chlorella vulgaris* Z-1, TMN (total microbial number), sanitary and microbiological condition, fishery waste water.

Н.Р. Акмуханова, А.К. Садвакасова, М.М. Төреханова,
М.Ө. Бауенова, А. Адақ, А. Карабекова, Б.К. Заядан

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: asem182010@gmail.com

Балық шаруашылығы қалдық суларының микробтық құрамына микробалдырлардың әсері

Мақалада *Chlorella vulgaris* Z-1 жасыл микробалдыры штаммының Саймасай ауылындағы балық шаруашылығының форель және бекіре тоғандарының қалдық суының санитарлық-микробиологиялық жағдайына әсерін зерттеу нәтижелері келтірілген. Балық шаруашылығының екі тоғанының қалдық суы оларда органикалық-минералды заттардың жоғары болуымен сипатталды. Тоғандардағы судың ЖМС санитариялық-бактериологиялық зерттеу нәтижелері бойынша $5,6-6,4 \times 10^5$ КОЕ/см³ су, коли – индексі – 10 құрады, аэромонад және псевдомонад бар екендігі байқалады. *Chl vulgaris* Z-1 микробалдырын бекіре және форель тоғандарының қалдық суларында өсіргеннен кейін микробиологиялық сипаттама едәуір жақсарды, ЖМС 70-75%-ға, коли индексі 5-ке азайды, Саймасай ауылындағы балық шаруашылығының суы ластану дәрежесі бойынша таза деп тануға болады. Бұл ретте екі тоғанның микрофлорасының морфологиялық құрамында таяқша тәрізді микроорганизмдер топтарының елеулі азаюы, кокк тәрізді бактериялар құрамының артуы және аэромонад пен псевдомонадтың болмауы байқалады. Микробалдырларды өсіргеннен кейін тазартылған судағы микроорганизмдердің физиологиялық топтарының ара қатынасының өзгеруі анықталды. Мысалы, аммонификациялаушы және денитрификациялаушы бактериялардың саны айтарлықтай төмендеді, ал нитрификациялаушы микроорганизмдердің саны айтарлықтай өсті, бұл құрамында аммонификациялау процесіне қатысқан жартылай ыдыраған органикалық қалдықтардың барын білдіреді.

Түйін сөздер: *Chlorella vulgaris* Z-1, ЖМС (жалпы микроб саны), санитарлық-микробиологиялық жағдай, балық шаруашылығының қалдық суы.

Введение

Рыбоводство, являясь одной из наиболее динамично развивающихся в настоящее время отраслей сельского хозяйства, представляет большой интерес в связи с высокой плодовитостью рыб, их способностью к быстрому росту и значительно низкими затратами на их культивирование. Кроме этого необходимо отметить о возрастающей потребности в высококачественной животноводческой продукции. При этом использование природных сырьевых ресурсов является приоритетным способом удовлетворения спроса на рыбную продукцию. Однако в последние годы результатом антропогенного влияния на водоемы является сокращение естественного воспроизводства рыбных запасов, отмечается постепенное снижение численности рыб в естественных водоёмах.

Развитие аквакультуры в естественных водоёмах включает комплекс мероприятий, ориентированный не только на сохранение и увеличение рыб, но и на качественное улучшение рыбной продукции. Контроль рыбохозяйственных водоемов проводится в двух ключевых направлениях: это качество воды и рыбы, что связано с основными требованиями в целях безопасности здоровья потребителя.

Так, при анализе экологического состояния исследуемых водоемов необходимо учитывать основные и интегральные показатели качества воды. Санитарное состояние воды является одним из важнейших аспектов жизнедеятельности всех живых организмов, где роль микроорганизмов, используемых в качестве информативных компонентов экосистем способных давать быстрый ответ на незначительные смены в экологических условиях, велика [1]. Поэтому бактериологический метод определения уровня загрязнения воды используемой для рыбохозяйственных целей наряду с химическими и биологическими методами, очень важен. В рыбохозяйственных прудах число микроорганизмов может сильно возрастать, поскольку, как известно, при искусственном кормлении рыб происходит накопление несъеденных кормов в воде, что и приводит к увеличению объемов неразложившихся органических веществ, и соответственно к ухудшению санитарного состояния воды. Так, возникают определенные условия для накопления и размножения различных патогенных бактерий [2,3,4]. В связи с этим практический интерес представляет получение информации о бактериальной обсемененности воды, поскольку с водой и условиями водопользования связано распространение

целого ряда инфекционных болезней человека [2, 5, 6].

Природные воды являются естественной средой обитания для фототрофных микроорганизмов, в том числе и микроводорослей, где благодаря им происходят процессы самоочищения воды. Однако именно их массовое культивирование дает возможность использования микроводорослей в процессах очистки сточных вод. Культивируя микроводоросли на сточных водах можно организовать качественный процесс очистки загрязненных водных экосистем, и как следствие наладить дешевую, но при этом экологически приемлемую технологию очистки воды, которая может быть использована дополнительно, как например в случаях сильного загрязнения водных объектов, или же в случае относительно небольшой степени загрязнения может заменить имеющиеся традиционные дорогие водоочистные сооружения.

Обеззараживающие свойства микроводорослей в отношении к патогенным и условно патогенным штаммам связано с их способностью продуцировать антибиотические вещества. Так, известно, что антибактериальными свойствами обладают представители различных таксономических групп микроводорослей, в частности это виды относящиеся к семействам *Dinophyceae*, *Chrysophyceae*, *Chlorophyceae* и *Bacillariophyceae* [6-13]. Имеющийся ряд исследований в этой области посвящен определению ингибирующего эффекта штаммов микроводорослей в отношении целого ряда бактерий и спектра его активности, кроме этого ряд исследований направлен на выявление биохимической природы взаимоотношений бактерий и водорослей. Так, первые исследования антибиотической активности микроводорослей были проведены в Индии Р. Пратом с его соавторами [6, 7]. В этих исследованиях использовались в основном морские микроводоросли, в то время как их пресноводные виды, в этом отношении изучены недостаточно. Однако известно, что пресноводные водоросли способны образовывать биологически активные соединения в являются ценным природным сырьем и потенциальным источником антибиотических веществ [8]. Так исследование антибиотических свойств микроводорослей в естественных и искусственных водоемах является крайне необходимым.

В связи с этим становится очевидным, актуальность исследования влияния микроводорослей на микробиологическую характе-

ристику рыбохозяйственных сточных вод. В данной статье приведены результаты изучения влияния штамма зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris Z-1* на санитарно-микробиологическое состояние сточной воды форелевого и осетрового прудов рыбного хозяйства.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта для изучения очистительного эффекта микроводорослей использовался штамм *Chlorella vulgaris Z-1*, выделенный из загрязненного водоема и подвергнутый авто-селекции на разных загрязненных средах. Для выявления способности микроводоросли расти на загрязнённой воде штамм *Chlorella vulgaris Z-1* культивировали в лабораторных условиях на сточной воде рыбного хозяйства. Микроводоросли предварительно выращивали на питательной среде 04 в колбах объемом 1000 мл при освещении 4000 люкс и температуре 25-28°C. Далее при масштабировании процесса культивирования микроводоросли использовали лабораторный фотобиореактор объемом 40 л. Пробы воды были взяты из осетровых, форелевых прудов рыбного хозяйства расположенный в селе Саймасай, Алматинской области. В качестве контроля использовалась жидкая среда Тамия. Контроль за темпом роста и размножением водорослей в культуре осуществляли на основании учета изменений их численности и биомассы с помощью камеры Горяева [9,10].

Пробы воды для бактериологического исследования отбирались в стерилизованную посуду с соблюдением правил асептики. Для определения общей бактериальной обсемененности сточных вод первичные бактериологические посевы проводили на МПА. Для количественного учета бактерий различных физиологических групп использовали элективные питательные среды: для выявления аммонификаторов – 1 % пептонная вода, для нитрификаторов первой фазы – среда Виноградского, для денитрификаторов среда Гильтая, казеиновый агар для обнаружения протеолитических бактерий, крахмальный агар для амилитических бактерий и среда Селибера с бром-тимол-блау для выявления липолитических бактерий. Представителей сем. *Enterobacteriaceae* выявляли бродильным методом в накопительной среде и затем инкубированием на среде Эндо при температуре 37 °С. Исследование биохимических, культуральных, морфологических свойств выделенных бакте-

рий проводили согласно ГОСТ ISO 7218-2011 «Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям» [11]. Выделенные изоляты бактерии отсеивали на МПА в пробирках, присваивали шифр, а затем по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам идентифицировали их до рода. Так, определение культуральных свойств проводили на дифференциальных питательных средах Эндо и ЖСА, устанавливали грампринадлежность и способности к капсуло- и спорообразованию методом микроскопии. При этом идентифицировали выделенные микроорганизмы по определителям [12,13]. Тесты на оксидазную и каталазную активности проводили в соответствии с ГОСТ 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа. Содержание аммиака и ионов аммония определяли с реактивом Несслера, нитритный азот – с реактивом Грисса, нитраты – с салицилатом натрия [14]. Содержание фосфатов определяли методом Морфи-Райли. Для определения БПК₅ пробы воды инкубировали в темноте при постоянной температуре 20°C в течении 6 дней с последующим определением концентрации растворенного в воде кислорода до и после инкубации [15]. Полученные в ходе исследования данные подвергали статистической обработке при помощи программы Statistika 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Вода являясь основой всех биопродукционных процессов водоёмов имеет важное значение в развитии рыбного хозяйства. Микробная обсемененность сточных вод рыбного хозяйства позволяет судить о степени загрязнения воды органическими веществами, ее минерализации и соответственно ее санитарном состоянии.

Микробиологическая характеристика рыбохозяйственных водоемов до культивирования микроводорослей

Проведены микробиологические исследования сточных вод до и после культивирования микроводорослей.

По результатам исследования пробы воды осетрового пруда имели слабощелочную реакцию среды, величина рН составляет 7,6. Пробы воды обладали характерными запахами и оценены по пятибалльной системе на пять. Сточная вода осетрового пруда характеризуется окисляемостью 28,8 мг/О₂, содержание аммиака составило 3,7 мг/л, концентрация нитритов и

нитратов 5,3 – 5,7 мг/л соответственно, концентрация фосфатов была в пределах 4,50 мг/л, биохимическое потребление кислорода (БПК₅) составило 10,2 мг/О₂/л. Пробы воды форелевого пруда также имели слабощелочную реакцию среды, величина рН составляет 7,6. Пробы воды обладали характерными запахами и оценены по пятибалльной системе на три. Сточная вода форелевого пруда характеризуется окисляемостью 15,2 мг/О₂, содержание аммиака здесь ниже – 2,3 мг/л, концентрации нитритов и нитратов тоже значительно низкие и составили 3,6 мг/л – 3,8 мг/л, содержание фосфатов – 4,24 мг/л, значение БПК₅ было 8,5 мг/О₂/л. Таким образом, сточные воды обеих исследуемых прудов характеризовались повышенным содержанием в них органических веществ, по сравнению общим требованиям поступающих вод форелевого и осетрового хозяйства [16].

По результатам проведения санитарно-бактериологических исследований воды осетровый пруд отнесен ко второй степени загрязнения водоемов (Табл. 1). При исследовании коли – индекс был равен 10, в воде были обнаружены аэромонады и псевдомонады. ОМЧ составило $6,4 \times 10^5$ КОЕ/см³.

Аналогичная картина наблюдалась и в пробах воды отобранных из форелевого пруда данного рыбохозяйственного водоема, где вода по уровню загрязненности тоже признана грязной и отнесена ко 2 степени загрязнения воды, коли – индекс (КИ) составил 10, ОМЧ было равно $5,6 \times 10^5$ КОЕ/см³, в пробах тоже отмечено наличие аэромонад и псевдомонад (табл. 1).

По морфологии среди выявленных бактерий в обеих прудах доминировали палочкообразные виды, в среднем их содержание составило 96 % от общей численности, содержание кокков составило 3 %. При этом выявленные бактерии были различных размеров, встречались клетки от самых мелких (менее 0,1 мкм) до самых крупных бактерий (более 0,5 мкм). Численно доминировали крупные палочки средний размер которых был в пределах 0,92 мкм³, которые составили более 50 % от общей численности бактерий.

В результате проведения микробиологических посевов в чистую культуру выделено 14 изолятов бактерий с различными морфотипами колоний. Среди них отмечено доминирование грамотрицательных бактерий – 10 культур из 14 изолятов. Большая часть выделенных изолятов (11 культур) обладали каталазной активностью. Анализ на подвижность показал,

способность к движению у 9 выделенных изолятов. Подробная характеристика культурально – морфологических и некоторых биохимических свойств выделенных культур микроорганизмов приведена в таблице 2. Анализ ферментативных

свойств выделенных чистых изолятов бактерий по результатам биохимических тестов установил, что глюкозу сбраживали 9 штаммов, 7 штаммов образовывали куслоту из мальтозы, 5 штаммов из арабинозы и 5 культур из сахарозы.

Таблица 1 – Санитарно – бактериологический анализ воды рыбохозяйственных прудов Саймасай

Объект исследования	ОМЧ КОЕ/см ³	КИ	Аэромонады	Псевдомонады	Категория водоема
Осетровый пруд	6,4x 10 ⁵	10	обнаружены невирулентные аэромонады	обнаружены невирулентные псевдомонады	2
Форелевый пруд	5,6x10 ⁵	10	обнаружены невирулентные аэромонады	обнаружены невирулентные псевдомонады	2

Таблица 2 – Культурально – морфологические и биохимические свойства выделенных культур микроорганизмов

Показатель	Выделенные чистые изоляты													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Форма клетки	п	п	к	п	к	п	п	п	к	п	п	п	п	п
Окраска по Граму	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Подвижность	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
Наличие спор		-	-		-		-		-	+	-			-
Тест на оксидазу	+	+	-			-	-	-	-		-	-		+
Тест на каталазу	+	+	+		-	+	+	+	+	+	+	+		+
Гидролиз желатина	+	-		+		+			+			-	+	-
Образование кислоты из:														
Глюкозы	+		+	+		+	+	+	+				+	+
Лактозы	-		-					+	+					+
Сахарозы	+		+					+				-	+	+
Мальтозы	+		+					+			+	+	+	+
Маннозы	+								+		+			
Арабинозы	-		+	+			+				+	+		-

Примечание: п-палочки, к-кокки, +-положительные,- отрицательные

По данным культурально-морфологической и биохимической идентификации выделенные изоляты были отнесены к следующим родам: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Flavobacterium*.

Бактериальная активность в прудах напрямую зависит от содержания в нем органического вещества и связана с технологией выращивания рыбы. Как известно численное значение бактерий достигает высоких значений особенно при

искусственном кормлении рыб, когда в водоемах наблюдается накопление несъеденных кормов и соответственно ухудшение экологической обстановки. Так количественное определение основных физиологических групп микроорганизмов, зависящих от типа водоема и от уровня антропогенной нагрузки актуально и необходимо для определения стадии минерализации органических веществ.

Согласно полученным результатам в наших образцах воды среди микроорганизмов, участвующих в круговороте азота (табл. 3) доминирова-

ли аммонифицирующие бактерии, численность которых в осетровых прудах составило 220 тыс. кл./мл, в форелевых прудах -180 тыс. кл./мл. Численность денитрифицирующих бактерий составила 18 и 17,5 тыс.кл/мл соответственно. Изучение количества нитрифицирующих бактерий показало что, их численность были в незначительном количестве по сравнению с аммонифицирующими и денитрифицирующими микроорганизмами.

Анализируя численность отдельных физиологических групп бактерий разлагающих органические вещества необходимо отметить в обеих рыбных хозяйствах преобладание амилитических бактерий, самой малочис-

ленной была группа липолитических бактерий. Доминирование протеолитических бактерий в воде возможно связано с большим содержанием углеводов в используемых кормах. Полученные данные свидетельствует о большом содержании в обеих прудах органических веществ и высокой активности гнилостной микрофлоры.

Таким образом, в сточных водах осетрового и форелевого пруда по численности доминировали аммонифицирующие, денитрифицирующие и амилитические бактерии. Выявлено снижение числа нитрификаторов 1-ой фазы, свидетельствующее о худшем санитарном состоянии воды в связи с нарастанием гнилостных процессов.

Таблица 3 – Численное соотношение различных физиологических групп бактерий в рыбохозяйственных водоемах

№	Показатель	Количество бактерий (тыс. кл/мл)	
		Осетровый пруд	Форелевый пруд
	Аммонификаторы	220±0,002	180±0,001
	Денитрификаторы	18±0,002	17,5±0,001
	Нитрификаторы	0,7±0,001	0,76±0,001
	Протеолитические бактерии	32±0,003	35±0,003
	Амилитические бактерии	170±0,002	158±0,002
	Липолитические бактерии	7,5±0,002	7,2±0,002

Рост микроводорослей на сточных водах рыбохозяйственных водоемов

Культивирование клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* Z-1 на исследуемой сточной воде выявил активный рост культуры как в контрольных, так и в опытных условиях, при этом необходимо отметить, что показатели роста культуры в условиях опыта были незначительно ниже контрольных показателей. Это доказывает что, сточные воды, включающие в свой состав органические вещества, могут быть эффективно использованы в качестве питательных сред. Исходное количество клеток в начале эксперимента составляло $0,5 \times 10^6$ кл/мл во всех опытных вариантах. Динамика роста клеток микроводорослей *Chl. vulgaris* Z-1 на сточных водах форелевого пруда на 6 сутки достигли на 5×10^6 кл/мл и осетрового пруда $5,2 \times 10^6$ кл/мл, в контрольном варианте количество клеток составило 6×10^6 кл/мл. Экспериментальные иссле-

дования динамики роста микроводорослей показали, что штамм хлореллы хорошо растут и развивается при заданных условиях культивирования. (рис.1).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о хорошем росте штамма *Chl. vulgaris* Z-1 в пробах воды рыбохозяйственного водоема. Это свидетельствует, что сточные воды рыбных хозяйств является благоприятной средой культивирования для микроводорослей. В процессе своей жизнедеятельности микроводоросли для построения клеток своего тела используют нитратный азот, фосфаты и углекислый газ, и при этом обогащают водную среду кислородом за счет фотосинтеза, в следствие чего происходит ускорение окислительных процессов и минерализация органических веществ. Это один из наиболее экологических способов очистки воды [17,18].

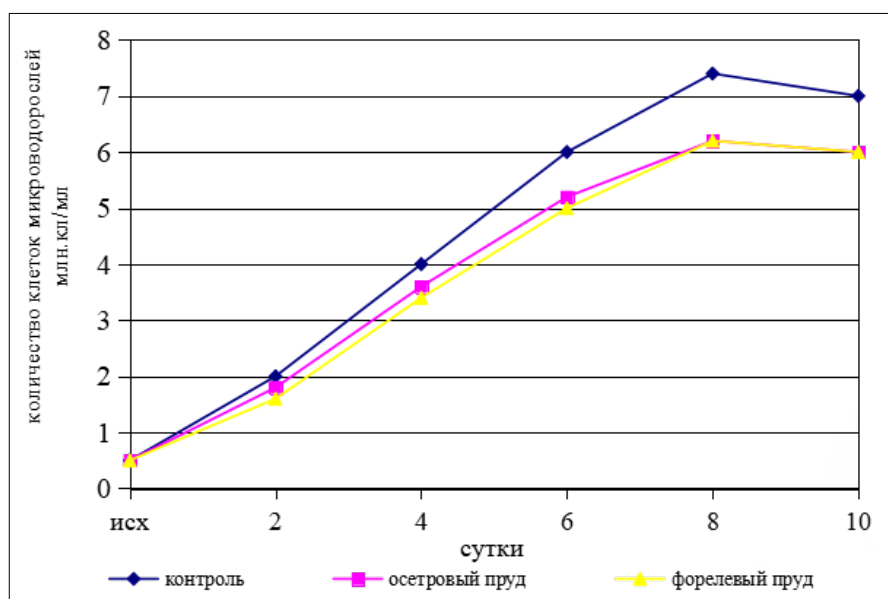


Рисунок 1 – Динамика роста зеленой микроводоросли *Chl vulgaris Z-1* при культивировании в пробах воды рыбохозяйственных водоемов

Микробиологическая характеристика рыбохозяйственных водоемов после культивирования микроводорослей

По результатам проведения санитарно-бактериологического анализа воды исследуемых прудов рыбного хозяйства после культивирования микроводорослей отмечено

уменьшение коли – индекса до 5, и полное исчезновение аэромонад и псевдомонад в обоих прудах. Показатели ОМЧ составили $1,8 \times 10^3$ КОЕ/см³ для осетрового пруда и $1,2 \times 10^3$ КОЕ/см³ для форелевого пруда рыбного хозяйства, соответственно, категория по степени загрязненности воды признана чистой (табл. 4).

Таблица 4 – Санитарно – бактериологический анализ воды рыбохозяйственных прудов Саймасай после культивирования микроводорослей

Объект исследования	Число микроорганизмов, КОЕ/см ³	КИ	Аэромонады	Псевдомонады	Категория водоема
Осетровый пруд	$1,8 \times 10^3$	5	не обнаружено	не обнаружено	1
Форелевый пруд	$1,2 \times 10^3$	5	не обнаружено	не обнаружено	1

В морфологическом составе микрофлоры обоих прудов наблюдается заметное уменьшение групп палочковидных микроорганизмов, и увеличение содержания кокковидных бактерий. В результате проведения микробиологических посевов выделены в чистую культуру бактерии рода: *Sarcina*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Flavobacterium*.

Установлено изменение соотношения физиологических групп микроорганизмов в очищенной воде после культивирования микро-

водорослей. Так, заметно снижалась численность аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий, по сравнению с нитрифицирующими микроорганизмами (табл. 5).

Если до культивирования микроводорослей нитрифицирующие микроорганизмы в воде были в незначительном количестве, то после их культивирования численность данных бактерий заметно увеличилась, что связано с содержанием кислорода в воде. Известно, что под влиянием микроводорослей увеличивается содержание кислорода в среде и как след-

ствие происходит быстрое окисление органики в процессе нитрификации [19]. Таким образом, фототрофные микроорганизмы как и растения,

в процессе своей жизнедеятельности обогащая воду кислородом создают благоприятные кислородные условия для нитрификации [20].

Таблица 5 – Численное соотношение различных физиологических групп бактерий в рыбохозяйственных водоемах после культивирования микроводорослей

№	Показатель	Количество бактерий (тыс. кл/мл)	
		Осетровый пруд	Форелевый пруд
	Аммонификаторы	96±0,002	98±0,002
	Денитрификаторы	2,5±0,001	3,1±0,001
	Нитрификаторы	155,5±0,002	157±0,002
	Протеолитические бактерии	1,2±0,001	1,5±0,001
	Амилитические бактерии	0,8±0,001	0,8±0,001
	Липолитические бактерии	-	-

Выявлено, что численность бактерий, участвующих в трансформации органических веществ в обоих рыбных прудах заметно уменьшилось. Роста липолитических микроорганизмов, участвующих в расщеплении жира после культивирование микроводорослей не наблюдалось.

Таким образом, развитие аквакультуры напрямую зависит от используемых водных ресурсов и предъявляет очень высокие требования к санитарно-бактериологическому состоянию водоемов. Ухудшение санитарно-бактериологического состояния водоемов связано с накоплением в воде продуктов жизнедеятельности рыб в виде органических веществ и их производных. По результатам исследования после культивирования микроводорослей *Chl vulgaris* Z-1 в сточных водах осетрового и форелевого пруда заметно улучшилась микробиологическая характеристика, ОМЧ уменьшилось на 70-75 %, коли индекс на 5, что воды рыбных прудов, по степени загрязненности можно признать чистой. Также изменилось количество физиологических групп микроорганизмов участвующих в круговороте азота и в трансформации органических веществ. Такие изменения в бактериальном фоне воды исследуемых прудов на прямую связаны с культивированием в них фототрофного компонента, который в первую очередь снабжает среду кислородом и способствует процессу нитрификации, кроме этого проявляя антимикробный эффект в отношении гетеротрофного компонента сокращают численность бактерий в среде. В лабораторных культурах и в природе между водорослями и бактериями

могут складываться различные взаимоотношения, включающие как элементы симбиоза, так и антагонизма [21]. Так, в литературе немало сведений о негативном влиянии водорослей на бактерии, где при использовании водорослевых экстрактов наблюдается бактериостатическая либо бактерицидную активность [22]. Так, приводятся сведения об антибактериальном действии метаболитов таких фототрофных микроорганизмов, как цианобактерия *Microcystis aeruginosa*, одноклеточной морской водоросли *Platymonas viridis* и солоноводной одноклеточной желто-зеленой микроводоросли *Nephrochloris salina* в отношении некоторых штаммов стафилококков, протей, кишечной палочки и вибрионов [19]. Имеются данные о антибиотических свойствах соленлюбивой зеленой микроводоросли *Dunaliella salina*. Так, отмечено подавления роста энтеробактерий под влиянием экстракта этой галофильной микроводоросли, что возможно связано с белково-хлорофильным комплексом микроводоросли, обладающим выраженным бактерицидным эффектом [23,24]. Приводятся сведения о бактерицидном действии экстрактов культуральных жидкостей зеленых микроводорослей *Scenedesmus obliquus* и *Chlorella vulgaris* в отношении условно-патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella* sp. [25]. Антагонистический характер взаимодействия водорослей с сопутствующими микроорганизмами может быть обусловлен лизоцимной активностью водорослей, а также возможно антагонистическое действие перекиси водорода образуемой в результате фотосинтеза [26].

Полученные результаты позволяют заключить, что культивирование микроводорослей *Chl. vulgaris Z-1* в сточных водах форелевого и осетрового хозяйства положительно влияет на микробный состав сточных вод. В обеих исследуемых сточных водах ОМЧ уменьшилось на 70-75 %, коли индекс на 5, что воды рыбных прудов, по степени микробной загрязненности можно признать чистой. Также изменилось количество физиологических групп микроорганизмов участвующих в круговороте азота и в трансформации органических веществ. Таким образом, микроводоросли представляют большой интерес в процессах регулирования

санитарного состояния воды, в том числе воды рыбохозяйственных водоемов, обеспечивая недорогую и экологически чистую технологию очистки сточных вод, при котором к тому же происходит накопление биомассы микроводорослей, которая может быть использована на различные нужды, в том числе и как кормовая добавка в сельском хозяйстве.

Работа выполнена при поддержке проекта МОН РК: AP05131743 «Разработка научно-методических основ технологии биомониторинга и прогнозирования состояния загрязненных водных экосистем с применением фототрофных микроорганизмов».

Литература



- 1 Брагинский Л.П., Крайнюкова А.Н. Методы оценки токсичности сточных вод и перспективы их использовании в контроле природных вод // Методы биоиндикации и биотестирования природных вод. Л.: Гидрометеониздат, 1989.- С.194-203.
- 2 Pradhan J., Das S. and Das B. K. Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2014. 8(32). 809-818
- 3 Syed Sh., Arasu A. and Ponnuswamy I. The Uses of Chlorella Vulgaris as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bioactive Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology. 2015. 7(1). 185-190.
- 4 Scott A.C. Laboratory control of antimicrobial therapy. In: Mackie & McCartney Practical medical microbiology (Edited by, Collee JG, Duguid JP, Fraser AG and Marmion BP) 13th Edn. Vol 2. United Kingdom-Edinburgh: Churchill Livingstone. 1989. 161-181.
- 5 Hend A. and Perveen K. Antibacterial activity and morphological changes in human pathogenic bacteria caused by Chlorella vulgaris extracts. Biomed Res- India. 2017. (28)4. 1610-1614
- 6 Pratt R., Daniel T.C., Eier J.B., Gunnison J.B., Kumler W.D., Oneto J.F., Strait L.A., Spoehr H.A., Hardin G.J, Milner H.W, Smith H., Strain H.H. Chlorellin. An antibacterial substance from chlorella. Science. 1944. 99. 351-352
- 7 Bukholder, P.R., L.M. Burkholder & I.R. Almodovar. 1960. Antibiotic activity of some marine algae of Puerto Rico. Bot. Mar. 2: 149-156.
- 8 Jaki, B., J. Helimann & O. Sticher. 2000. New antimicrobial metabolites from the cyanobacterium Nostoc commune. J. Nat. Prod. 63: 1283.
- 9 Заядан Б.К., Садвакасова А.К., Акмуханова Н.Р. Биотехнология фототрофных микроорганизмов. Алматы: «Қазақ университеті», 2019. -350 с.
- 10 Заядан Б.К., Садвакасова А.К., Акмуханова Н.Р. Фототрофты микроорганизмдердің биотехнологиясы бойынша зерханалық практикум//Оқу құралы, Қазақ университеті, 2018, -262 б. ISBN 978-601-04-3133-1
- 11 ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям
- 12 Берджи. Определитель бактерий. М.: Мир, 1997. – 799 с.
- 13 Методические указания по санитарно- бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов №13-4-2-/1738, утвержденные 27 сентября 1999 г // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: Отдел маркетинга АМБ – агро. 1999. Ч. 2. С. 161–177
- 14 Рекомендации по методам производства анализов на сооружениях биохимической очистки промышленных сточных вод. – М., 1970.
- 15 Заядан Б.К., Усербаева А., Болатхан К., Сарсекеева Ф., Садвакасова А.К. Безотходная технология очистки сточных вод с получением биодизельного топлива на основе штамма микроводоросли – продуцента масла. Вестник КазНУ. Серия биологическая. №3/1(59). 2013. С. 100–103
- 16 Guo Z, Liu Y, Guo H, Yan S and Mu J, Microalgae cultivation using anaquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. JEnvironSci 25:S85–S88 (2013).
- 17 Арапова А. В. Биологическое удаление азота и фосфора из городских сточных вод: дис. канд. техн. наук: 03.00.16 : защищена 24.12.04 // Арапова А. В. – М.2004. – 192 с.
- 18 Б.К. Заядан, А.К. Садвакасова, Д.К. Кирбаева, К. Болатхан, М. Салех, М. Бауенова. Безотходная технология биологической очистки сточных вод с помощью микроводорослей// Kaznu Bulletin. Ecology series. №2/2 (38). 2013

- 19 Дзюбан А.Н. Оценка экологического состояния водохранилищ по критериям бактерио- бентоса // Гидробиол. журн. – 2004. – №4. – С. 32-33.
- 20 Горобец О.Б., Блинкова Л.П., Батуро А.П. Влияние микроводорослей на жизнеспособность микроорганизмов в естественной и искусственной среде обитания. Журн. микробиол. 2001. 1: 104-108
- 21 Игнатенко М.Е. Характеристика симбиотических связей микроорганизмов в альгобактериальных сообществах природных водоемов. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Оренбург, 2008. С. 19.
- 22 Abedin RM, Taha HM. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 2008;3(1):22-31.
- 23 Зенова Г.М., Штина Э.А., Дедыш С.Н. и др. Экологические связи водорослей в биоценозах. Микробиология. 1995. 2: 149 – 164.
- 24 Гольдин Е.Б., Гольдина В.Г. Антибактериальные свойства метаболитов водорослей в модельных экспериментах. Альгология. 1999. 2: 34.
- 25 Немцева Н.В., Селиванова Е.А., Плотников А.О. Роль симбиотических взаимодействий в выживании микроорганизмов в гипергалинных водоемах. Журн. микробиол. 2006. 4: 117120.
- 26 Игнатенко М.Е., Немцева Н.В. Механизмы взаимодействия автотрофного и гетеротрофного компонентов в альгобактериальных сообществах. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). 2012. №3

References

- 1 Abedin RM, Taha HM. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 2008;3(1):22-31.
- 2 Arapova A. B. Biologicheskoye udaleniye azota i fosfora iz gorodskikh stochnykh vod: dis. kand. tekhn. nauk: 03.00.16 : zashchishchena 24.12.04 // Arapova A. B. – M.2004. – 192 s.
- 3 Braginskiy L.P., Kraynyukova A.N. Metody otsenki toksichnosti stochnykh vod i perspektivy ikh ispol'zovaniy v kontrole prirodnnykh vod // Metody bioindikatsii i biotestirovaniya prirodnnykh vod. L.:Gidrometeoizdat, 1989.- S.194-203.
- 4 Burkholder, P.R., L.M. Burkholder & I.R. Almodovar. 1960. Antibiotic activity of some marine algae of Puerto Rico. Bot. Mar. 2: 149-156.
- 5 Berdshi. Opredelitel' bakteriy. M.: Mir, 1997. – 799 s.
- 6 Dzyuban A.N. Otsenka ekologicheskogo sostoyaniya vodokhranilishch po kriteriyam bakterio- bentosa // Gidrobiol. zhurn. – 2004. – №4. – S. 32-33.
- 7 Gol'din Ye.B., Gol'dina V.G. Antibakterial'nyye svoystva metabolitov vodorosley v model'nykh eksperimentakh. Al'gologiya. 1999. 2: 34.
- 8 GOST ISO 7218-2015 Mikrobiologiya pishchevykh produktov i kormov dlya zhivotnykh. Obshchiye trebovaniya i rekomendatsii po mikrobiologicheskim issledovaniyam
- 9 Guo Z, Liu Y, Guo H, Yan S and Mu J, Microalgae cultivation using anaquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. J Environ Sci 25:S85–S88 (2013).
- 10 Gorobets O.B., Blinkova L.P., Batur A.P. Vliyaniye mikhrovodorosley na zhiznesposobnost' mikroorganizmov v yestestvennoy i iskusstvennoy srede obitaniya. Zhurn. mikhrobiol. 2001. 1: 104-108
- 11 Hend A. and Perveen K. Antibacterial activity and morphological changes in human pathogenic bacteria caused by *Chlorella vulgaris* extracts. Biomed Res- India. 2017. (28)4. 1610-1614
- 12 Ignatenko M.Ye., Nemtseva N.V. Mekhanizmy vzaimodeystviya avtotrofnogo i geterotrofnogo komponentov v al'gobakterial'nykh soobshchestvakh. Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN (elektronnyy zhurnal). 2012. №3
- 13 Ignatenko M.Ye. Kharakteristika simbioticheskikh svyazey mikroorganizmov v al'gobakterial'nykh soobshchestvakh prirodnnykh vodoyemov. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. Orenburg, 2008. S. 19.
- 14 Jaki, B., J. Helimann & O. Sticher. 2000. New antimicrobial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune*. J. Nat. Prod. 63: 1283.
- 15 Metodicheskiye ukazaniya po sanitarno- bakteriologicheskoy otsenke rybokhozyaystvennykh vodoyemov №13-4-2-/1738, utverzhdenyye 27 sentyabrya 1999 g // Sbornik instruksiy po bor'be s boleznyami ryb. M.: Otdel marketinga AMB – agro. 1999. CH. 2. C. 161–177
- 16 Nemtseva N.V., Selivanova Ye.A., Plotnikov A.O. Rol' simbioticheskikh vzaimodeystviy v vyzhivaniy mikroorganizmov v gipergalinnnykh vodoyemakh. Zhurn. mikhrobiol. 2006. 4: 117120.
- 17 Pradhan J., Das S. and Das B. K. Antibacterial activity of freshwater microalgae: A review. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2014. 8(32). 809-818
- 18 Pratt R., Daniel T.C., Eier J.B., Gunnison J.B., Kumler W.D., Oneto J.F., Strait L.A., Spoehr H.A., Hardin G.J, Milner H.W, Smith H., Strain H.H. Chlorellin. An antibacterial substance from *Chlorella*. Science. 1944. 99. 351-352
- 19 Rekomendatsii po metodam proizvodstva analizov na sooruzheniyakh biokhicheskoy ochistki promyshlennykh stochnykh vod. – M., 1970.
- 20 Syed Sh., Arasu A. and Ponnuswamy I. The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bioactive Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology. 2015. 7(1). 185-190.

- 21 Scott A.C. Laboratory control of antimicrobial therapy. In: Mackie & McCartney Practical medical microbiology (Edited by, Collee JG, Duguid JP, Fraser AG and Marmion BP) 13th Edn. Vol 2. United Kingdom-Edinburgh: Churchill Livingstone. 1989. 161-181.
- 22 Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Akmuhanova N.R. Biotechnology of phototrophic microorganisms. Almaty: "Kazakh University", 2019. -350.
- 23 Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Akmuhanova N.R. Laboratornaya praktika po biotekhnologii fototrofnykh mikroorganizmov // Uchebnik Kazakhskogo universiteta, 2018, -262 s. ISBN 978-601-04-3133-1
- 24 B.K. Zayadan, A.K. Sadvakasova, D.K. Kirbayeva, K. Bolatkhan, M. Salekh, M. Bauyenova. Bezotkhodnaya tekhnologiya biologicheskoy ochistki stochnykh vod s pomoshch'yu mikrovdorosley// Kaznu Bulletin. Ecology series. №2/2 (38). 2013
- 25 Zayadan B.K., Userbayeva A., Bolatkhan K., Sarsekeyeva F., Sadvakasova A.K. Bezotkhodnaya tekhnologiya ochistki stochnykh vod s polucheniym biodizel'nogo topliva na osnove shtamma mikrovdorosli – produtsenta masla. Vestnik KazNU. Seriya biologicheskaya. №3/1(59). 2013. С. 100–103
- 26 Zenova G.M., Shtina E.A., Dedysh S.N. i dr. Ekologicheskiye svyazi vdorosley v biotsenozakh. Mikrobiologiya. 1995. 2: 149 – 164.

Б.З. Абделиев^{1,2} , Д.Т. Есимсейт², А.А. Абдирасилова², А.К. Касенова²,
З.Ж. Абдел², А.К. Рысбекова², Б.Б. Атшабар², Ж.К. Мирзатаев², Ж.Ж. Чунетова¹ 

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: abdelbeck@gmail.com

²Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева,
Казахстан, г. Алматы

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМ ГОСТИНИЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГОРОДА АЛМАТЫ НА КОНТАМИНИРОВАННОСТЬ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*

Легионеллез – сапронозное острое инфекционное заболевание с летальностью около 10% при легочной форме, обусловленное различными видами микроорганизмов, относящихся к роду *Legionella*. Согласно современной литературе, более 90% легионеллезов имеют сходство с видом *Legionella pneumophila*. Абиотические объекты окружающей среды являются основным местом обитания для легионелл. Обычно легионелла высевается из жидкостей кондиционеров, промышленных и домашних систем охлаждения, бойлерных и душевых установок, оборудования для респираторной терапии. Наблюдениями доказано, что частота заболеваемости возбудителем легионеллеза у путешественников несколько выше, чем у людей, не меняющих своего местонахождения.

Целью настоящей работы явилось исследование на контаминированность *Legionella pneumophila* искусственных водных систем четырех гостиниц города Алматы. Материалом для анализов были выбраны смывы из различных объектов водных систем и пробы воды. Бактериологические исследования образцов не дали положительных результатов. Исследование методом ПЦР из 30 проб было выявлено 4 позитивных образца в одной из гостиниц. Было выяснено, что температура воды в системе горячего водоснабжения не превышает 40-60°C круглогодично. Оптимальная температура в системах водопользования для роста бактерий – 25-60°C.

Ключевые слова: легионеллез, *Legionella*, ПЦР, участки гена, бактериология, молекулярно-генетический метод.

B.Z. Abdeliyev^{1,2}, D.T. Yessimseit², A.A. Abdirassilova², A.K. Kassenova²,
Z.Zh. Abdel², A.K. Rysbekova², B.B. Atshabar², Zh.K. Mirzatayev², Zh.Zh. Chunetova¹

¹Al-Farabi Kazakh national university, Kazakhstan, Almaty, e-mail: abdelbeck@gmail.com

²M. Aikimbayev national scientific center for particularly dangerous infections, Kazakhstan, Almaty

Research results of artificial water systems of hotel complexes in Almaty for contamination of *Legionella pneumophila*

Legionellosis is a sapronous acute infectious disease, with a mortality rate of about 10% in the pulmonary form, caused by various types of microorganisms belonging to the genus *Legionella*. According to current data, about 90% of legionellosis is associated with the species *L. pneumophila*. The main habitat of *Legionella* is abiotic environmental objects. *Legionella* in the majority of cases is sown from respiratory therapy equipment, air conditioning fluids, home and industrial cooling systems, shower and boiler installations. Observations have shown that the incidence of legionellosis in travelers is slightly higher than in people who do not change their location.

The purpose of this work was to study the contamination of *L. pneumophila* in artificial water systems of four hotels in Almaty. Flushes from various objects of water systems and water samples were selected as the material for analysis. Bacteriological studies of the samples did not yield positive results. A PCR study of 30 samples revealed 4 positive samples in one of the hotels. It was found that the water temperature in the hot water system does not exceed 40-60°C all year round. The optimal temperature in water use systems for bacterial growth is 25-60°C.

Key words: Legionellosis, *Legionella*, PCR, gene sections, bacteriology, molecular genetic method.

Б.З. Абделиев^{1,2}, Д.Т. Есимсейт², А.А. Абдирасилова², А.К. Касенова²,
З.Ж. Абдел², А.К. Рысбекова², Б.Б. Атшабар², Ж.К. Мирзатаев², Ж.Ж. Чунетова¹

¹Эл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: abdelbeck@gmail.com

²Масғұт Айқымбаев атындағы аса қауіпті инфекциялар ұлттық ғылыми орталығы, Қазақстан, Алматы қ.

Legionella pneumophila контаминациялығына Алматы қаласындағы қонақ үй кешендерінің жасанды су жүйелерін зерттеу нәтижелері

Legionella pneumophila – легионеллез ауруын туғызатын бастерия қоздырғышы [лат. *Legionelloses*]. Легионеллез («легионерлер ауруы»; басқа атаулары – Брэгг форт безгегі, легионелла инфекциясы, понтиак безгегі, питтсбург пневмониясы) жұқпалы ауру, ол өкпе қабынуымен немесе респираторлы аурумен, ағзаның улануы және де қызбасымен сипатталады. Жаңа мәліметтер бойынша, легионеллалардың 90%-ға жуығы *Legionella pneumophila* түріне тиесілі. Легионеллалардың негізгі мекен орны – қоршаған ортаның абиотикалық объектілері. Алайда легионелла салқындатқыш сұйықтықтарынан, өнеркәсіптік және тұрмыстық салқындату жүйелерінен, респираторлық терапияға арналған құрал-жабдықтардан, бойлер және себезгі қондырғыларынан анықталады. Саяхатшылардың легионеллезбен ауыру жиілігі өзінің орнын өзгертпейтін адамдарға қарағанда бірталай жоғары екендігі дәлелденді.

Бұл жұмыстың негізге мақсаты *Legionella pneumophila* контаминациясына Алматы қаласындағы төрт қонақ үйінің жасанды су жүйелерін зерттеу болып табылады. Материал ретінде талдауға су жүйелерінің әртүрлі нысандарынан су сынамалары мен шайындылары таңдалып алынды. Үлгілердің бактериологиялық зерттеулерінен оң нәтиже алынған жоқ. Қонақ үйлердің бірінде полимеразды тізбекті реакция әдісімен зерттеу барысында отыз сынаманың төртеуі оң нәтиже берді. Ыстық су жүйесінде судың температурасы жыл сайын қырық пен алпыс градус Цельсий арасында екендігі анықталды. Бактериялардың өсуіне су жүйелеріндегі оптималды температура – 25-60°C.

Түйін сөздер: *Legionella*, легионеллез, бактериология, молекулалық-генетикалық әдіс, ген ауданы, ПТР.

Введение

Легионеллез («заболевание легионеров»; остальные наименования – лихорадка форта Брэгг, легионелла-инфекция, понтиакская лихорадка, питтсбургская воспаление легких) – острое инфекционное болезнь, обусловленное разными видами микроорганизмов, имеющих отношение к роду *Legionella* [1, 2]. Болезнь проходит с проявленной лихорадкой, интоксикацией, поражением органов пищеварения, центральной нервной системы и легких. Согласно современной литературе более 90% легионеллезов имеют сходство с видом *Legionella pneumophila*. Среди остальных видов легионелл почаше всего болезнь вызывают виды *Legionella Bozemanii*, *Legionella Dumoffii*, *Legionella Longbeuchae* и *Legionella micdadei* [3-5]. Легионеллы морфологически грамотрицательные аэробные палочки, способные длительное время сохраняться в находящейся вокруг среде. В основном легионеллы имеют заостренные концы. Капсул у Легионелл отсутствуют. Редко палочки имеют шансы выкрашиваться грамположительно, но клеточная стена легионелл имеет обычное грамотрицательное строение [6].

Название легионеллез связано со вспышкой тяжелой инфекционной пневмонии в июле и ав-

густе 1976 года в Филадельфии, как скоро инфицировались двести двадцать один соучастник съезда американских легионеров, из которых тридцать четыре умерли.

Тест прошлых случаев болезни пневмониями неясной этиологии после обнаружения возбудителя рода *Legionella* доказал, что многочисленная заболеваемость на съезде Американского легионеров – не первое явление пневмонии, вызванной микробами рода *Legionella*. Невзирая на данный прецедент, заболевание возымела название «заболевания легионеров», и только потом была предложена систематика легионеллезов. Впервые грамотрицательная бацилла, отнесенная к роду *Legionella*, была выделена Чарльзом Шепардом и Джозефом Мак-Дейдом в 1977 году, через полгода после описанной вспышки [7].

До 1976 года регистрировались случаи пневмонии непонятной этиологии. После того, как был найден возбудитель легионеллеза, начали организовываться исследовательские работы, нацеленные на определение и уточнение этиологии старых вспышек. В итоге проделанных анализов и полученных итогов получилось определить, что *Legionella pneumophila* являлась возбудителем вспышек в 1957 [8], 1959, 1965 [9] и 1974 годах [10].

Систематика легионеллёзов на нынешний день еще никак не устоялась. Тем не менее обычно все легионеллёзы подразделяют на понтиакскую лихорадку и на болезнь легионеров [11].

Заболевание легионеров проходит в виде тяжкой пневмонии, течение ее имеет возможность существовать злокачественным. Понтиакская лихорадка проходит с явлениями гипертермии, интоксикации, однако в отсутствии показателей пневмонии [12]. Для лихорадки форта Брэгг [13] типично формирование экзантемы и поднятие температуры.

Наряду с медицинской систематикой легионеллёзов есть и бактериологическая классификация, содержащаяся в серотипировании возбудителя. В данное время классифицирование по серогруппам в клинике не используется. Это связано с рядом технических проблем, имеющих место в виду трудности и разнородности антигенного состава легионелл [14].

Абиотические объекты окружающей среды считаются основным местом обитания для легионелл. Резервуар возбудителя – это грунт и вода, в природе легионеллы обнаруживаются в пресных водоёмах как паразиты неких организмов и/либо симбионты сине-зелёных водорослей. Исключительно лучшая для размножения легионелл температура наружной среды – 40-60°C.

Нужно подметить, что с природной нишей, где обитают легионеллы, есть и искусственного происхождения – сделанная человеком ниша, а конкретно водные системы, где циркулирует вода оптимальной температуры. В таковых системах формируются условия для образования в атмосфере мелкодисперсного бактериального аэрозоля. Так, легионеллёз считается и техногенной инфекцией [15]. Легионелла, в основной массе случаев, высевается из жидкостей кондиционеров, промышленных и домашних систем охлаждения, бойлерных и душевых установок, оборудования для респираторной терапии и т.д. Известно также, что легионелла нередко колонизирует резиновые плоскости (к примеру, такие как: шланги водопроводного, промышленного и мед. оснащения). Легионелл также обнаруживают в тёплых водах, скидываемых электростанциями [16].

Наблюдениями подтверждено, что частота заболеваемости возбудителем легионеллеза у путников несколько выше, нежели у людей, не меняющих своего местонахождения. Это связывают со сменой погодных условий (и, следовательно, изменением резистентности организма), а также с использованием разных

технических автотранспортных средств, которые имеют все шансы служить средой для размножения возбудителя легионеллеза [17]. К примеру, в соединенных штатах посреди всех заболевших легионеллём в 2005-2006 годах 23-25% пришлось на долю путников [18]. Глобальные эпидемические вспышки в отелях явились поводом для создания единой международной системы эпидемиологического наблюдения за случаями легионеллеза, связанного с путешествиями [19].

За период с 2002-2006 год во Франции, Испании и Италии наблюдался 641 случай легионеллеза посреди путников [20]. В большинстве случаев, это массовые болезни. Был проведён тест, в каком месте останавливались путники: оказалось, что в 7% случаев находились на пассажирских судах, в 10% в кемпингах, а в 83% всех случаев инфицирования они останавливались в гостиницах. Нужно выделить, что данная пропорция характерна для каждой из 3-х государств [21].

Данные о патогенезе легионеллеза известно совершенно не много. Известно, что слизистая оболочка респираторного тракта является воротами для инфекции. Проникание возбудителя в организм происходит при вдыхании водных аэрозолей (фонтаны, увлажнители систем искусственного происхождения вентиляции лёгких, ультразвуковые распылители воды, душ, ванна, кондиционеров воздуха). Легионеллы имеют все шансы существовать в организме амёб. К примеру, известно, что в 1-ой вспышке заболевания легионеров в 1976 году через систему кондиционирования попали именно амёбы, имеющие патогенные бактерии [22]. Невзирая на то, что в мокроте нездоровых обнаруживаются легионеллы, прецедентов передачи инфекции от человека к человеку не известно.

Большая часть случаев болезни легионеллём связано с поражением лёгких. Легионеллы прикрепляются к альвеолярным макрофагам нижних дыхательных путей через рецепторы комплемента и засасываются в их лизосомы, таким образом предотвращая собственную гибель, и имеет возможность свободно размножаться в кислой среде [23].

Цель работы

Целью настоящей работы явилось исследование на контаминированность *Legionella pneumophila* искусственных водных систем гостиниц города Алматы.

Материалы и методы

Материалом для наших анализов были вымывы с мылом из различных объектов водных систем (душевые головки, переливной желоб бассейнов и джакузи, стенки градирни, сливы воды в саунах, раковины) и пробы воды (водопроводные сети, систем технологических циклов, градирни, бассейны, фонтаны) из четырех гостиниц г. Алматы.

Отбор проб воды. Из одной точки отбирали 1 пробу воды объемом 0,5 л в стерильные емкости с завинчивающимися крышками.

Отбор проб из крана. Краны дезинфицированы путем обжигания огнем с использованием пропитанного спиртом ватного тампона. Предварительно производился спуск воды в течение 2-3 мин.

Смывы. Отбор проб производили с помощью стерильных ватных тампонов на палочке, предварительно увлажненных стерильным физиологическим раствором. С влажных поверхностей смывы производили сухим тампоном. Тампоны с пробой помещали в стерильную пробирку, содержащую 5 мл физиологического раствора.

Для исследования анализируемых проб применялись бактериологический и молекулярно-генетический (ПЦР) методы.

Бактериологическое исследование. Пробы воды для обнаружения *L. pneumophila* предварительно концентрировали фильтрацией через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Filter membranes microbiological analysis, «SIGMA-ALDRICH», Germany) в приборе. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносили обожженным анатомическим пинцетом в стерильный флакон объемом 100 мл с 10 мл стерильного физиологического раствора. Перед фильтрованием каждой новой пробы прибор обеззараживали. Для десорбции микрофлоры с фильтров флакон помещали на встряхиватель на 10-15 мин при температуре +18-25°C. Полученный смыв с поверхности фильтра помещали в центрифужную пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 3000-6000 об./мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость полностью удаляли. Осадок ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора и переносили в стерильную пробирку.

Посев подготовленных проб материала проводили на чашки Петри со средой (среда, приготовленная из F.G. Agar). Чашки инкубировали при +37±1°C до 7 дней во влажной атмосфере. Подозрительные на легионеллы колонии про-

сматривали стереомикроскопически, начиная с 3-х суток.

Молекулярно-генетическое исследование. Для анализа использовали 0,1 мл предварительно сконцентрированного образца. Обеззараживание исследуемого материала осуществляли добавлением 300 мкл лизирующего буфера, содержащего 6М гуанидинтиоцианата, с последующей инкубацией при +65°C в течение 10 мин. После такой обработки пробы считаются обеззараженными.

Выделение ДНК. Выделение ДНК из проб воды и смывов осуществляли с помощью набора реагентов «ДНК-Сорб-В» («АмплиСенс», Россия). Работу проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору.

Постановка ПЦР. Для амплификации ДНК ставилась реакция на выявления гена *tip* в режиме «реального времени», с применением тест-системы «*Legionella pneumophila*-FL» («АмплиСенс», Россия). Исследования и учет результатов проводили согласно прилагаемой к тест-системе инструкции.

Для ПЦР-амплификации использовался термоциклер «Rotor-Gene Q» («QIAGEN», Германия) с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Амплификация ДНК *L. pneumophila* регистрируется по каналу флуоресценции JOE/Yellow/HEX. Образцы считаются положительными, если значение Ct на канале JOE/Yellow менее 33.

Результаты и обсуждение

Всего было исследовано 30 образцов воды и смывов, отобранных из ванн разных номеров, в душевых общего пользования для персонала и постояльцев гостиниц, в СПА и бассейнах четырех элитных гостиниц, градирнях, санитарных узлах города Алматы. Для конфиденциальности, гостиницы будут обозначены условно – А, В, С и D. Исследования водных систем гостиниц были проведены дважды: в сентябре и в декабре 2018 г.

Бактериологические исследования образцов не дали положительных результатов.

При исследовании методом ПЦР 17 проб в сентябре 2018 г. было выявлено два позитивных образца, отобранных в гостинице «С». Маркерный ген *tip* *L. pneumophila* был выявлен в образцах смывов из головки душа гостевого номера и душевой общего пользования для клиентов. Результаты исследований представлены на рисунке 1 и в таблице 1 (Ct<33.00).

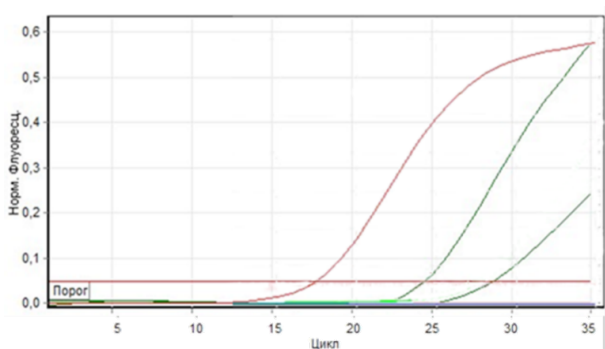


Рисунок 1 – График накопления продуктов амплификации участка ДНК *tir* гена (*L. pneumophila*), сентябрь 2018 г.

Таблица 1 – Исследованные образцы и результаты амплификации на наличие гена *tir* возбудителя легионеллёза, сентябрь 2018 г.

№	Наименование	Тип	СТ
1	Смыв (душевая)	Образец	отрицательный
2	Смыв (желобок бассейна)	Образец	- // -
3	Смыв (фонтан)	Образец	- // -
4	Смыв (чаша, хамам)	Образец	- // -
5	Вода (кран, хамам)	Образец	- // -
6	Смыв (паровая)	Образец	- // -
7	Смыв (сан. клаб. душ)	Образец	24,63
8	Смыв (комната №321, душ)	Образец	отрицательный
9	Вода (комната №321, кран)	Образец	- // -
10	Смыв (комната №418, душ)	Образец	28,91
11	Вода (комнаты №418, кран)	Образец	отрицательный
12	Вода (резервуар)	Образец	- // -
13	Смыв (резервуар)	Образец	- // -
14	Смыв (мужская раздевалка, душ)	Образец	- // -
15	Вода (мужская раздевалка, кран)	Образец	- // -
16	Вода (мужской туалет, кран)	Образец	- // -
17	Пит. вода (резервуар)	Образец	- // -
18	К-	Отрицательный контроль	- // -
19	К+	Положительный контроль	17,11

При опросе сотрудников, обслуживающих систему водоснабжения, было выяснено, что температура воды в системе горячего водоснабжения не превышает 40-60°C круглогодично. Оптимальными температурными условиями для роста бактерий является температура в системах водопользования 25-60°C [24]. Дезинфекционные мероприятия – хлорирование воды, дезинфекция помещений, оборудования проводится регулярно. Отсутствие роста на питательных средах, выявление положительных результатов при исследовании только смывов, положительные результаты ПЦР на почти 25 и 26 циклах может быть косвенным показателем незначительной концентрации *L. pneumophila* в системе водоснабжения. Тем не менее, наличие *L. pneumophila* и *Legionella* spp. даже в низкой концентрации (менее 10³ КОЕ на литр воды) в системе водоснабжения, водных растворах чревато возникновением клинических случаев легионеллёза, что при наличии большого числа восприимчивых лиц может способствовать возникновению, как спорадических случаев, так и развитию вспышки болезни. Была рекомендована тепловая промывка всех систем, как холодного, так и горячего водоснабжения, постоянный контроль температуры горячей воды на точках выхода и поддержания ее на уровне 65°C и выше; повторная дезинфекция воды, помещений и оборудования.

Через 3 месяца был проведен повторный отбор 13 проб из гостиницы «С». Вновь было выявлено методом ПЦР наличие геномного материала *L. pneumophila* в смывах из душевых головок в номере и душевой общего пользования (рис. 2 и табл. 2). Точки взятия образцов были другие. Бактериологические исследования дали отрицательный результат.

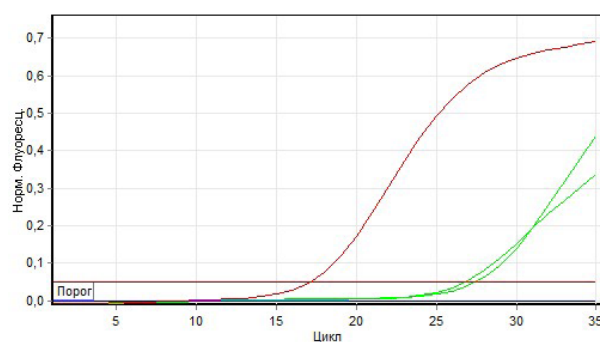


Рисунок 2 – График накопления продуктов амплификации участка ДНК *tir* гена (*L. pneumophila*), декабрь 2018 г.

Таблица 2 – Исследованные образцы и результаты амплификации на наличие гена *mip* возбудителя легионеллёза, декабрь 2018 г.

№	Наименование	Тип	СТ
1	Смыв с головки душа (душевая, СПА, слева бассейн)	Образец	отрицательный
2	Смыв с головки душа (душевая, СПА, справа бассейн)	Образец	-//-
3	Смыв (СПА, бассейн)	Образец	-//-
4	Смыв (СПА, хамам)	Образец	-//-
5	Смыв (хамам)	Образец	-//-
6	Смыв (душевая, хамам)	Образец	-//-
7	Смыв (комната №108, кран)	Образец	-//-
8	Смыв (комната №108, душ)	Образец	-//-
9	Смыв (комната №313, кран)	Образец	-//-
10	Смыв (комната №313, душ)	Образец	-//-
11	Смыв (комната №540, кран)	Образец	-//-
12	Смыв (комната №540, душ)	Образец	27,53
13	Смыв (муж. душевая)	Образец	26,83
14	К- при выд.	Отрицательный контроль	отрицательный
15	К-	Отрицательный контроль	-//-
16	К+	Положительный контроль	17,11

При опросе выяснилось, что температура воды в системе горячего водоснабжения не была

повышена. Была проведена разъяснительная беседа с врачом (санитарный врач) о риске заражения сотрудников, гостей, в том числе иностранцев возбудителем легионеллёза, возникновения эпидемии. Рекомендована повторная дезинфекция, установка специальных фильтров, полностью исключающих соприкосновение людей с легионеллами, в душевых и других точках выхода системы водоснабжения. Систему водоснабжения гостиницы в случае поддержания температуры горячей воды до 55°C и ниже на точках выхода рекомендовано ежемесячно контролировать на наличие *L. pneumophila* и *Legionella* spp. до момента установления температурного режима до уровня 65°C.

Полученные данные, говорят, что легионеллы являются не столь редким, сколь редко выявляемым возбудителем. С учетом тяжести течения заболевания, вызываемого данным возбудителем – около 10% летальных исходов при легионеллезной пневмонии, – актуальность более широкого охвата объектов, потенциальных источников заражения, не вызывает сомнения. Микробиологическое исследование данных систем на наличие легионелл необходимо осуществлять не реже 2 раз в год [25]. К началу 2019 года в городе Алматы имеется около 215 гостиниц и данных о мониторинге легионелл в них отсутствует.

Авторы работы выражают признательность и благодарность дезинфектору лаборатории Нуртаевой Ултай Асубаевне за участие и помощь в проведении данных исследований!

Литература


- 1 Ryan K.J., Ray C.G. «Sherris Medical Microbiology» // – McGraw Hill, 2003. – С. 992. – ISBN 0-838585-29-9;
- 2 Swanson M., Heuner K. «Legionella: Molecular Microbiology» // Caister Academic Pr, 2008. – С. 249. – ISBN 1-904455-26-3;
- 3 Chee C.E., Baddour L.M. «Legionella maceachernii soft tissue infection» // Lippincott Williams & Wilkins the American journal of the medical sciences. 2007. – Vol. 334, no. 5. – P. 410-413;
- 4 Kubota M., Tomii K., Tachikawa R., Harada Y., Seo R., Kaji R., Takeshima Y., Hayashi M., Nishimura T., Ishihara K. «Legionella longbeachae pneumonia infection from home garden soil» / Nihon Kokyūki Gakkai zasshi = the journal of the Japanese Respiratory Society. 2007. – Vol. 45, no. 9. – P 698-703;
- 5 Phares C.R., Wangroongsarb P., Chantra S., Paveenkitporn W., Tondella M.L., Benson R.F., Thacker W.L., Fields B.S., Moore M.R., Fischer J., Dowell S.F., Olsen S.J. «Epidemiology of severe pneumonia caused by Legionella longbeachae, Mycoplasma pneumoniae, and Chlamydia pneumonia: population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand» // The University of Chicago Press Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2007. – No. 45. – P. 147-155;
- 6 Mathys W., Stanke J., Harmuth M., Junge-Mathys E. «Occurrence of Legionella in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating» // International journal of hygiene and environmental health. 2008. – Vol. 211, no. 1-2. – P. 179-185;
- 7 Поздеев О.К. Глава 20. «Прихотливые аэробные грамотрицательные палочки и коккобактерии» // Медицинская микробиология: учебное пособие / под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – С. 400. – 768 с. – 3000 экз. – ISBN 5-9704-0132-3;

- 8 Osterholm M.T., Chin T.D., Osborne D.O., Dull H.B., Dean A.G., Fraser D.W., Hayes P.S., Hall W.N. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant // Oxford University Press American journal of epidemiology. 1983. – No. 117. – P. 60-67;
- 9 Thacker S.B., Bennett J.V., Tsai T.F., Fraser D.W., McDade J.E., Shepard C.C., Williams K.H., Stuart W.H., Dull H.B., Eickhoff T.C. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium // University of Chicago Press The Journal of infectious diseases. 1978. – Vol. 138, no. 4. – P. 512-519;
- 10 Terranova W., Cohen M.L., Fraser D.W. 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features // Lancet Publishing Group Lancet. 1978. – Vol. 2, no. 8081. – P. 122-124;
- 11 Тартаковский И.С., Синопальников А.И. Легионеллёз: роль в инфекционной патологии человека // Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии и Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии СГМА Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – М.: Издательский дом «М-Вести», 2001. – Т. 3, № 1;
- 12 Pancer K., Stypulkowska-Misiurewicz H. Pontiac fever – non-pneumonic legionellosis (польск.) // Panstwowy Zaklad Wydawnictw Lekarskich Przegląd epidemiologiczny. 2003. – Т. 57, nr 4. – S. 607-612;
- 13 Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Тартаковский И.С., Карпова Т.И., Дронина Ю.Е., Садретдинова О.В., Козлов Р.С., Бобылева З.Д., Лещенко И.В., Михайлова Д.О., Рачина С.А. Практические рекомендации по диагностике и лечению легионеллёзной инфекции, вызываемой *Legionella pneumophila* серогруппы 1. Российское респираторное общество, Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2010. – С. 5;
- 14 Qasem J.A., Mustafa A.S., Khan Z.U. Legionella in clinical specimens and hospital water supply facilities: molecular detection and genotyping of the isolates // Karger Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre. 2008. – Vol. 17, no. 1. – P. 49-55;
- 15 Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Глава 21. «Общая характеристика сапронозов» // Эпидемиология. – СПб.: Фолиант, 2005. – С. 556. – 752 с. – ISBN 5-93929-111-2;
- 16 Лисукова Т., Чекалина К. «Легионеллёз» // Сестринское дело. 2000. – № 6;
- 17 de Olalla P.G., Gracia J., Rius C., Caylà J.A., Pañella H., Villabí J.R., Guix J., Pellicer T., Ferrer D., Cusi M., Pelaz C., Sabrià M.; «Grupo de trabajo del brote de Vallcarca. Community outbreak of pneumonia due to *Legionella pneumophila*: importance of monitoring hospital cooling towers = La infectología en Europa y América» // Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2008. – V. 26, no 1. – P. 15-22;
- 18 «Surveillance for Travel-Associated Legionnaires Disease» – United States, 2005-2006 // Centers for Disease Control and Prevention. 2007. – Vol. 56, no. 48. – P. 1261-1263;
- 19 Berdal B.P., editor. Legionella infections and atypical pneumonias. Proceedings of the 11th Meeting of the European Working Group on Legionella infections. 1996. – P. 87-92;
- 20 Rota M.C., Cano Portero R., Che D., Caporali M.G., Hernando V., Campese C. Clusters of travel-associated Legionnaires disease in Italy // European Centre for Disease Prevention and Control Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2007. – Vol. 12, no. 11. – P. 3-4;
- 21 Joseph C.A., Yadav R., Ricketts K.D.; European Working Group for Legionella Infections. Travel-associated Legionnaires disease in Europe in 2007 // European Centre for Disease Prevention and Control Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2009. – Vol. 14, no. 18. – P. 1-5;
- 22 Финлей Брет. Боевые искусства бактерий // В мире науки. – Россия: ЗАО «В мире науки», 2010. – № 4. – С. 48-49. – ISSN 0208-0621;
- 23 Hawn T.R., Berrington W.R., Smith I.A., Uematsu S., Akira S., Aderem A., Smith K.D., Skerrett S.J. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila* // The Journal of Immunology. 2007. – Vol. 179, no. 10. – P. 6981-6987. – ISSN 0022-1767;
- 24 «Эпидемиологический надзор за легионеллёзной инфекцией: Методические указания» – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – С. 35;
- 25 «Профилактика легионеллеза: Санитарно-эпидемиологические правила» – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – С. 22.

References

- 1 Ryan K.J., Ray C.G. «Sherris Medical Microbiology» // McGraw Hill, 2003. – С. 992. – ISBN 0-838585-29-9;
- 2 Swanson M., Heuner K. «Legionella: Molecular Microbiology» // Caister Academic Pr, 2008. – С. 249. – ISBN 1-904455-26-3;
- 3 Chee C.E., Baddour L.M. «Legionella maceachernii soft tissue infection» // Lippincott Williams & Wilkins the American journal of the medical sciences. 2007. – Vol. 334, no. 5. – P. 410-413;
- 4 Kubota M., Tomii K., Tachikawa R., Harada Y., Seo R., Kaji R., Takeshima Y., Hayashi M., Nishimura T., Ishihara K. «Legionella longbeachae pneumonia infection from home garden soil» / Nihon Kokyūki Gakkai zasshi = the journal of the Japanese Respiratory Society. – Japan, 2007. – Vol. 45, no. 9. – P. 698-703;
- 5 Phares C.R., Wangroongsarb P., Chantra S., Paveenkitiporn W., Tondella M.L., Benson R.F., Thacker W.L., Fields B.S., Moore M.R., Fischer J., Dowell S.F., Olsen S.J. «Epidemiology of severe pneumonia caused by *Legionella longbeachae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydia pneumoniae*: population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand» // The University of Chicago Press Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. – USA, 2007. – No. 45. – P. 147-155;

- 6 Mathys W., Stanke J., Harmuth M., Junge-Mathys E. «Occurrence of Legionella in hot water systems of single-family residences in suburbs of two German cities with special reference to solar and district heating» // *International journal of hygiene and environmental health*. – Germany, 2008. – Vol. 211, no. 1-2. – P. 179-185;
- 7 Pozdeyev O.K. Glava 20. «Prihotlivyye aerobnyye gramotritsatelnyye palochki i kokkobakterii» // *Meditsinskaya mikrobiologiya: uchebnoye posobiye / pod red. V.I. Pokrovskogo*. – 4-e izd. – M.: GEOTAR-Media. 2006. – S. 400. – 768 s. – 3000 ekz. – ISBN 5-9704-0132-3;
- 8 Osterholm M.T., Chin T.D., Osborne D.O., Dull H.B., Dean A.G., Fraser D.W., Hayes P.S., Hall W.N. A 1957 outbreak of Legionnaires' disease associated with a meat packing plant // *Oxford University Press American journal of epidemiology*. – USA, 1983. – No. 117. – P. 60-67;
- 9 Thacker S.B., Bennett J.V., Tsai T.F., Fraser D.W., McDade J.E., Shepard C.C., Williams K.H., Stuart W.H., Dull H.B., Eickhoff T.C. An outbreak in 1965 of severe respiratory illness caused by the Legionnaires' disease bacterium. // *University of Chicago Press The Journal of infectious diseases*. – USA, 1978. – Vol. 138, no. 4. – P. 512-519;
- 10 Terranova W., Cohen M.L., Fraser D.W. 1974 outbreak of Legionnaires' Disease diagnosed in 1977. Clinical and epidemiological features / *Lancet Publishing Group Lancet*. – Great Britain, 1978. – Vol. 2, no. 8081. – P. 122-124;
- 11 Tartakovskiy I.S., Sinopalnikov A.I. Legionellez: rol v infektsionnoy patologii cheloveka (rus.) // *Mezhregionalnaya assotsiatsiya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoy khimioterapii i Nauchno-issledovatel'skiy institut antimikrobnoy khimioterapii SGMA Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. – M.: Izdatelskiy dom «M-Vesti». 2001. – T. 3. № 1;
- 12 Pancer K., Stypulkowska-Misiurewicz H. Pontiac fever – non-pneumonic legionellosis. // *Panstwowy Zaklad Wydawnictw Lekarskich Przegląd epidemiologiczny*. – Poland, 2003. – T. 57, nr 4. – S. 607-612;
- 13 Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Tartakovskiy I.S., Karpova T.I., Dronina Yu.E., Sadretidinova O.V., Kozlov R.S., Bobyleva Z.D., Leshchenko I.V., Mikhaylova D.O., Rachina S.A. Prakticheskiy rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu legionellezoy infektsii. vyzyvayemoy Legionella pneumophila serogruppy 1. – Moskva: Rossiyskoye respiratornoy obshchestvo. Mezhregionalnaya assotsiatsiya po klinicheskoy mikrobiologii i antimikrobnoy khimioterapii. 2010. – S. 5;
- 14 Qasem J.A., Mustafa A.S., Khan Z.U. Legionella in clinical specimens and hospital water supply facilities: molecular detection and genotyping of the isolates // *Karger Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. – Switzerland, 2008. – Vol. 17, no. 1. – P. 49-55;
- 15 Zuyeva L.P., Yafayev R.Kh. Glava 21. «Obshchaya kharakteristika sapronozov». // *Epidemiologiya*. – SPb.: Foliant. 2005. – S. 556. – 752 s. – 3000 ekz. – ISBN 5-93929-111-2;
- 16 Lisukova T., Chekalina K. «Legionellez» // *Sestrinskoye delo*. 2000. – № 6;
- 17 de Olalla P.G., Gracia J., Rius C., Caylà J.A., Pañella H., Villabí J.R., Guix J., Pellicer T., Ferrer D., Cusi M., Pelaz C., Sabrià M.; «Grupo de trabajo del brote de Vallcarca. Community outbreak of pneumonia due to Legionella pneumophila: importance of monitoring hospital cooling towers = La infectología en Europa y América». // *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2008. – V. 26, no 1. – P. 15-22;
- 18 «Surveillance for Travel-Associated Legionnaires Disease» – United States, 2005-2006. // *Centers for Disease Control and Prevention*. 2007. – Vol. 56, no. 48. – P. 1261-1263;
- 19 Berdal B.P., editor. Legionella infections and atypical pneumonias. Proceedings of the 11th Meeting of the European Working Group on Legionella infections; 1996. – P. 87-92;
- 20 Rota M.C., Cano Portero R., Che D., Caporali M.G., Hernando V., Campese C. Clusters of travel-associated Legionnaires disease in Italy // *European Centre for Disease Prevention and Control Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. – Sweden, 2007. – Vol. 12, no. 11. – P. 3-4;
- 21 Joseph C.A., Yadav R., Ricketts K.D.; European Working Group for Legionella Infections. Travel-associated Legionnaires disease in Europe in 2007. // *European Centre for Disease Prevention and Control Euro surveillance: bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. – Sweden, 2009. – Vol. 14, no. 18. – P. 1-5;
- 22 Finley Bret. Boyevyye iskusstva bakteriy (rus.) // *V mire nauki*. – Rossiya: ZAO «V mire nauki». 2010. – № 4. – S. 48-49. – ISSN 0208-0621;
- 23 Hawn T.R., Berrington W.R., Smith I.A., Uematsu S., Akira S., Aderem A., Smith K.D., Skerrett S.J. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with Legionella pneumophila. // *The Journal of Immunology*. – USA, 2007. – Vol. 179, no. 10. – P. 6981-6987. – ISSN 0022-1767;
- 24 «Epidemiologicheskii nadzor za legionelleznoy infektsiyey: Metodicheskiye ukazaniya» – M.: Federalnyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora. 2009. – S. 35;
- 25 «Profilaktika legionelleza: Sanitarno-epidemiologicheskiye pravila» – M.: Federalnyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora. 2010. – S. 22.

**А.А. Айтжанова¹, Е.А. Олейникова¹, М.Г. Саубенова¹,
С.Т. Даугалиева¹, Р.Ж. Бержанова²** 

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии», Казахстан, г. Алматы

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы,
e-mail: aida_91_20@mail.ru

ОТБОР АНТАГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ МОЛОКА РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Кисломолочные продукты составляют основную часть функциональных ферментированных пищевых продуктов, обладающих широким спектром полезных для здоровья свойств. Одним из направлений полезного действия кисломолочных продуктов является способность бактерий, используемых в качестве заквасок, к подавлению болезнетворных и вызывающих порчу продуктов питания микроорганизмов. Молоко различных видов животных отмечается в научной литературе в качестве ценного источника для выделения новых видов микроорганизмов. Нами выделено 28 изолятов биотехнологически ценных молочнокислых бактерий из сырого кобыльего, верблюжьего и козьего молока. Исследована антагонистическая активность изолятов из сырого молока различных видов животных и ферментированного кобыльего молока (кумыса) в отношении ряда бактериальных тестовых культур. Показан широкий спектр антибактериальной активности изолятов из кумыса в отношении *Escherichia coli*, *Sarcina flava*, *S. flava* T, *Salmonella dublin*, *Mycobacterium citreum*, *M. rubrum*, I вакцины Ценковского. Проведена молекулярно-генетическая идентификация 12 отобранных микроорганизмов. Антагонистически активные молочнокислые бактерии кумыса определены как *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* и *L. diolivorans*. Отобранные штаммы будут использованы для создания заквасок для получения столовых и профилактических напитков и продуктов с направленным действием.

Ключевые слова: кумыс, молочнокислые бактерии, антагонизм, антибактериальная активность, молекулярно-генетическая идентификация.

A.A. Aitzhanova¹, E.A. Oleinikova¹, M.G. Saubanova¹,
S.T. Daugalieva¹, R.Zh. Berzhanova²

¹LP "Scientific Production Center for Microbiology and Virology", Kazakhstan, Almaty

²al-Farabi Kazakh National University (MES RK), Kazakhstan, Almaty,
e-mail: aida_91_20@mail.ru

Selection of antagonistically active strains of lactic acid bacteria from milk of various animal species

Dairy products make up the bulk of functional fermented foods with a wide range of health benefits. One of the beneficial effects of fermented products is the ability of bacteria used as starter cultures to suppress pathogens and food spoilage microorganisms. Milk of various animal species is noted in the scientific literature as a valuable source for the isolation of new types of microorganisms. We selected 28 isolates of biotechnologically valuable lactic acid bacteria from raw mare, camel and goat milk. The antagonistic activity of isolates from raw milk of various animal species and fermented mare's milk (koumiss) in relation to a number of bacterial test cultures was studied. A wide spectrum of antibacterial activity of isolates from koumiss against *Escherichia coli*, *Sarcina flava*, *S. flava* T, *Salmonella dublin*, *Mycobacterium citreum*, *M. rubrum*, I Tsenkovsky vaccine was shown. Molecular genetic identification of 12 selected microorganisms was carried out. Antagonistically active lactic acid bacteria of koumiss are defined as *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* and *L. diolivorans*. Selected microorganisms will be used to create starter cultures for table and preventive beverages and products with directed action.

Key words: koumiss, lactic acid bacteria, antagonism, antibacterial activity, molecular genetic identification.

А.А. Айтжанова¹, Е.А. Олейникова¹, М.Г. Саубенова¹,
С.Т. Даугалиева¹, Р. Ж. Бержанова²

¹«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы», ЖШС, Қазақстан, Алматы қ.

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті (ҚР БҒМҚ), Қазақстан, Алматы қ.,
e-mail: aida_91_20@mail.ru

Әр түрлі жануарлардың сүтінен алынған сүтқышқылды бактериялардың антагонистік белсенді штаммдарын іріктеп алу

Сүтқышқылды өнімдерден денсаулыққа пайдалы көптеген қасиеттері бар ферменттелген функционалды өнімдердің басым бөлігін құрайды. Сүтқышқылды өнімдердің пайдалы әсерінің бірі – ауру және азық-түлік өнімдерінің бұзылуын тудыратын микроорганизмдерді басу қабілеті бар, ашытқы ретінде қолданылатын бактериялардың қасиеті. Әртүрлі жануарлардың сүті ғылыми әдебиеттерде микроорганизмдердің жаңа түрлерін бөліп алудың құнды көзі ретінде атап өтілген. Біз жылқы, түйе және ешкі сүтінен биотехнологиялық құнды сүтқышқылды бактериялардың 28 изолятын бөліп алдық. Бірқатар бактериялық сынақ культураларына қатысты әртүрлі жануарлардың шикі сүті мен ашытылған бие сүтінен (қымыз) алынған изоляттардың антагонистік белсенділігі зерттелді. Қымыздан алынған изоляттардың *Escherichia coli*, *Sarcina flava*, *S. flava* T, *Salmonella dublin*, *Mycobacterium citreum*, *M. rubrum*, Ценковский I вакциналарына қарсы антибактериалды белсенділігінің кең спектрі көрсетілді. Таңдалған 12 микроорганизмге молекулалық-генетикалық идентификация жүргізілді. Қымыздың антагонистік белсенді сүтқышқылды бактериялары *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* және *L. diolivorans* болып табылады. Таңдалған штаммдар тағамдық және профилактикалық сусындарға және бағытталған әрекеті бар өнімдерге арналған ашытқылар жасау үшін қолданылады.

Түйін сөздер: қымыз, сүтқышқылды бактериялар, антагонизм, бактерияға қарсы белсенділік, молекулалық-генетикалық идентификация.

Введение

Ферментация – известная с древних времен форма сохранения пищевых продуктов, которая также улучшает их пищевую ценность. Во многих регионах мира ферментированные напитки известны своими полезными для здоровья свойствами.

С развитием научных знаний оказалось, что потребление ферментированных продуктов связано с многочисленными преимуществами для здоровья, обусловленными биохимическими изменениями компонентов пищи и повышением их пищевой и биологической ценности, а также введением жизнеспособных микроорганизмов, имеющих потенциал пробиотических [1, 2].

Исследования показали, что при регулярном потреблении ферментированных продуктов улучшаются показатели работы практически всех систем организма, поскольку они, подавляя патогенные организмы и нормализуя микрофлору желудочно-кишечного тракта человека, положительно влияют на состояние организма, в частности его иммунного статуса и мозга, оказывают нейропротекторное действие и улучшают память [3-6]; нормализуют артериальное давление и массу тела, работу печени, кишечника, состояние кожи, укрепляют костную ткань [7-15]; облегчая воспаление, контролируют окислительный стресс, приводящий к когнитивной дис-

функции и нейродегенеративным заболеваниям, и снижают степень тревожного состояния и депрессии [3, 5]; способствуют восстановлению после трансплантации органов и абдоминальной хирургии, обеспечивают снижение некоторых факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, а также снижают последствия воздействия патогенов [4, 7].

У ферментированных продуктов все чаще отмечаются свойства, далеко выходящие за пределы сохранности и улучшения органолептических показателей, а польза от их потребления, значительно больше, чем сумма воздействия их отдельных микробных, питательных или биологически активных компонентов. Это вызывает интерес к особенностям микроорганизмов, осуществляющих ферментацию, и их метаболитов, попадающих в желудочно-кишечный тракт через продукты питания и напитки.

Потребительский рынок функциональных продуктов в настоящее время более чем на половину представлен кисломолочными продуктами, антагонистическая активность заквасок которых предотвращает дисбактериоз и интоксикацию организма. Продукты на молочной основе составляют примерно 43% функционального рынка напитков и в основном состоят из сброженных продуктов [16].

Высокая пищевая и биологическая ценность молока еще больше повышается при его фермен-

тации. Бактериальные закваски, используемые при их приготовлении, фактически являются уникальными пробиотиками, адаптированными к пищеварительному тракту человека [17, 18]. Коррекции микрофлоры кишечника, и, следовательно, профилактики различных заболеваний, традиционно добивались использованием кисломолочных продуктов, приготовленных с помощью молочнокислых бактерий. Полезное действие молочнокислых продуктов обусловлено их подавляющим действием по отношению к ряду микроорганизмов, в том числе и к болезнетворным организмам [19, 20]. Такое действие обусловлено способностью молочнокислых бактерий накапливать молочную кислоту, бактерицины и другие вещества (перекись водорода, уксусная, бензойная кислоты и др.), прекращающие развитие вредных бактерий в кишечнике, что, как правило, приводит к торможению гнилостных процессов и прекращению образования токсичных продуктов распада. Конкуренционное взаимодействие молочнокислых бактерий с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами [21, 22], а также продукция ими антимикробных пептидов [23-25], экспериментально доказаны.

Молочная кислота придает напитку не только определенные вкусовые качества, но и определяет его диетические и профилактические свойства. Результатом её работы является активизация выделения пищеварительных ферментов в кишечный тракт и стимулирование их действия. Благодаря молочной кислоте в организме повышается усвоение фосфора и кальция.

Молочнокислые бактерии являются одной из наиболее изученных групп микроорганизмов, однако интерес к ним не проходит, и в научной литературе постоянно появляются сведения об их новых полезных свойствах.

В связи с растущим спросом на функциональные продукты на потребительском рынке промышленная микробиология нуждается в отвечающих поставленным целям высокопродуктивных штаммах микроорганизмов, обеспечивающих получение искомым продуктам с заданными свойствами. Кроме того, повышение распространенности антибиотико-резистентных инфекций [26-28], а также остро проявившаяся проблема пищевой безопасности делают [26, 29-34] отбор новых штаммов молочнокислых бактерий продуцентов антагонистически активных веществ особо актуальным.

Молоко различных видов животных является хорошим источником для выделения микроорга-

низмов с потенциальными и новыми пробиотическими свойствами [35-37].

Целью настоящей работы было выделение молочнокислых бактерий из молока различных видов животных (не коровьего), оценка биотехнологического потенциала полученных изолятов и отбор потенциально пробиотических штаммов микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью.

Материалы и методы исследования

Молочнокислые бактерии выделяли из кобыльего (саумал), верблюжьего и козьего молока высевам на среде MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) из десятикратных разведений в стерильной водопроводной воде. Микроорганизмы отбирали из колоний различных по морфологии типов. Отдельную колонию помещали в пробирку с 5 мл молока. Первичный отбор проводили по способности к подкислению и свертыванию коровьего молока в течение 48 часов. Накопление кислоты в среде определяли с помощью индикаторной лакмусовой бумаги.

В работе использованы также изоляты молочнокислых бактерий, полученных из ассоциаций на коровьем молоке и молочной сыворотке пяти антагонистически активных в отношении условно-патогенных дрожжей рода *Candida* образцов кумыса [38].

У отобранных изолятов исследовали антагонистическую активность методом лунок [38] в отношении бактериальных тест-культур: *Escherichia coli*, *Sarcina flava*, *S. flava* T, *Salmonella dublin*, *Mycobacterium citreum*, *M. rubrum*, I вакцина Ценковского. Бактериальные тесты культивировали на среде МПА. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч, для *Mycobacterium* – 48 ч.

Все эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов исследований производили по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента [39]. Уровень значимости $p < 0,05$.

Молекулярно-генетическую идентификацию биотехнологически ценных изолятов молочнокислых бактерий проводили секвенированием 16s РНК по Сэнгеру.

Результаты исследования и их обсуждение

Из молока различных видов животных выделено в целом 28 изолятов молочнокислых бактерий: из кобыльего – 11, козьего – 9, верблюжьего – 8.

Из ассоциаций кумыса на коровьем молоке и молочной сыворотке отобрано 12 изолятов молочнокислых бактерий, характеризующихся хорошим сбраживанием коровьего молока.

Определена антагонистическая активность отобранных изолятов молочнокислых бактерий в отношении дрожжевых и бактериальных тест культур. Выявлено, что изоляты молочнокислых бактерий, выделенные из сырого молока различных видов животных (козьего, кобыльего, верблюжьего), обладают антагонистической активностью в отношении только двух бактериальных тестовых культур: *S. flava* и *M. citreum* (Таблица 1), что, наиболее вероятно, связано с продукцией молочной кислоты данными изолятами молочнокислых бактерий.

Средний диаметр зон подавления роста *S. flava* изолятами из кобыльего, козьего и верблюжьего молока составляет (13,8±0,5), (12,1±0,7) и (12,1±0,8) мм соответственно; а *M. citreum* соответственно (14,5±0,7), (13,1±0,7) и (13,8±0,4) мм.

Поскольку наиболее высокие средние показатели антагонистической активности показаны для изолятов из кобыльего молока, сделано предположение о более высоком шансе получении антагонистически активных штаммов молочнокислых бактерий из ферментированного кобыльего молока. Кроме того, в предыдущей работе была показана противогрибковая активность ассоциаций кумыса в отношении условно-патогенных дрожжей рода *Candida*. С целью выявления перспективных микроорганизмов проведен анализ изолятов, отобранных после серии последовательных пересевов естественно ферментированного кобыльего молока (кумыса) в коровьем молоке и молочной сыворотке.

Результаты исследования антибактериальной активности выделенных культур представлены в таблице 2. Все 12 отобранных изолятов молочнокислых бактерий проявили способность к подавлению всех тестовых культур микроорганизмов.

Проведена молекулярно-генетическая идентификация изолятов из кумыса.

Таблица 1 – Антибактериальная активность молочнокислых бактерий из молока различных видов животных

№	Изолят	Источник выделения	Зоны подавления роста, мм	
			<i>S. flava</i>	<i>M. citreum</i>
1	2	Кобылье молоко	15,0±1,0	13,0±2,0
2	2-2		17,3±0,7	16,0±1,0
3	3		11,0±0	15,0±0
4	5		15,0±2,0	17,0±0
5	6		14,0±1,0	13,0±0
6	8		13,5±1,5	11,0±1,0
7	9		15,0±0	18,5±0,5
8	10		12,5±0,5	13,0±0
9	13		14,5±2,5	17,0±1,0
10	14		12,5±0,5	11,5±0,5
11	15		12,0±0	15,0±0
12	1	Козье молоко	16,0±1,0	12,0±1,0
13	2		16,0±0	15,5±0,5
14	3		13,0±0	13,0±1,0
15	4		14,5±0,5	16,0±0
16	5		14,0±3,0	11,5±0,5
17	6		15,0±0	15,0±1,0
18	7		13,5±0,5	11,0±0
19	8		14,0±2,0	14,0±1,0
20	9		12,5±1,5	10,7±0,3

Продолжение таблицы 1

№	Изолят	Источник выделения	Зоны подавления роста, мм	
			<i>S. flava</i>	<i>M. citreum</i>
21	1-2	Верблюжье молоко	16,0±1,0	11,0±0,5
22	1-3		12,0±0	14,5±2,5
23	1-4		14,5±0,5	16,0±0
24	2-1		14,5±1,5	17,0±1,0
25	2-2		15,0±0,7	12,0±1,0
26	2-3		13,0±1,0	12,5±0,5
27	2-4		13,0±1,0	10,8±0,3
28	2-5		13,0±0	17,0±0

Таблица 2 – Антибактериальная активность молочнокислых бактерий кумыса в отношении бактериальных тестовых культур

№	Изолят	Вид	Диаметр зон подавления роста, мм						
			<i>Salm. dublin</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. citreum</i>	<i>M. rubrum</i>	<i>S. flava</i>	<i>S. flava T</i>	<i>I. Вакцина Ценковского</i>
1	4М-2а-1	<i>L. rhamnosus</i>	18,5±0,5	17,5±0,5	11,5±0,5	11,5±0,5	16,5±0,5	14,5±0,5	14,5±0,5
2	4М-2г		18,5±0,5	19,5±0,5	11,5±0,5	11,5±0,5	17,5±0,5	14,5±0,5	20,5±1,5
3	A15	<i>L. fermentum</i>	18,5±0,5	16,5±0,5	17,5±0,5	15,0±0	12,5±0,5	14,5±0,5	11,5±0,5
4	10		17,5±0,5	15,5±0,5	13,0±1,0	13,0±1,0	18,5±0,5	11,5±0,5	16,5±1,5
5	1М-КК	<i>L. paracasei</i>	18,5±0,5	19,0±1,0	12,0±1,0	15,0±1,0	16,5±0,5	13,5±1,5	16,5±0,5
6	2М-3		16,5±0,5	16,5±0,5	16,5±1,5	13,0±1,0	19,5±0,5	15,5±0,5	15,5±0,5
7	4М-2В-КВ		17,0±1,0	17,5±0,5	14,5±0,5	25,0±1,0	14,5±0,5	13,0±1,0	15,5±0,5
8	4М-6В		17,0±0,5	19,5±0,5	11,5±0,5	15,5±0,5	12,5±0,5	13,5±1,5	12,5±1,5
9	7М ВVK		19,0±1,0	19,5±0,5	11,5±0,5	13,0±1,0	13,0±1,0	13,5±0,5	13,0±1,0
10	7М KB		17,5±0,5	15,5±0,5	12,5±0,5	16,5±0,5	13,0±1,0	11,5±0,5	14,5±0,5
11	1М-ВВ	<i>L. diolivorans</i>	14,5±0,5	13,0±1,0	18,5±0,5	14,0±1,0	15,0±1,0	15,5±0,5	12,5±0,5
12	1СВК		13,0±1,0	16,5±0,5	13,0±1,0	12,5±0,5	13,5±0,5	13,5±0,5	13,0±1,0

Выделенные молочнокислые бактерии идентифицированы как *Lactobacillus paracasei* (ассоциации кумыса №№ 1, 2, 4, 7), *L. fermentum* (№6), *L. rhamnosus* (№4) и *L. diolivorans* (№1). Степень гомологии с ближайшими штаммами составила от 99,54% до 100%. Филогенетические древа отобранных молочнокислых бактерий кумыса представлены на рисунке 1.

Шесть из двенадцати технологически перспективных изолятов отнесены по результатам молекулярно-генетического анализа к виду *L. paracasei*. Бактерии этого вида выделены почти из всех исследованных ассоциаций кумыса, под-

вергнутых серии пересевов на коровьем молоке. Из ассоциаций кумыса, поддерживаемых на молочной сыворотке, выделен лишь один штамм молочнокислых бактерий – *L. diolivorans* 1с-бк. При высеве ассоциаций с сыворотки на среду MRS отмечено большое количество дрожжей и уксуснокислых бактерий.

Наличие в образцах кумыса выделенных видов молочнокислых бактерий отмечено различными авторами, исследующими микрофлору кумыса [40-46]. При этом частота встречаемости указанных видов варьирует в различных регионах.

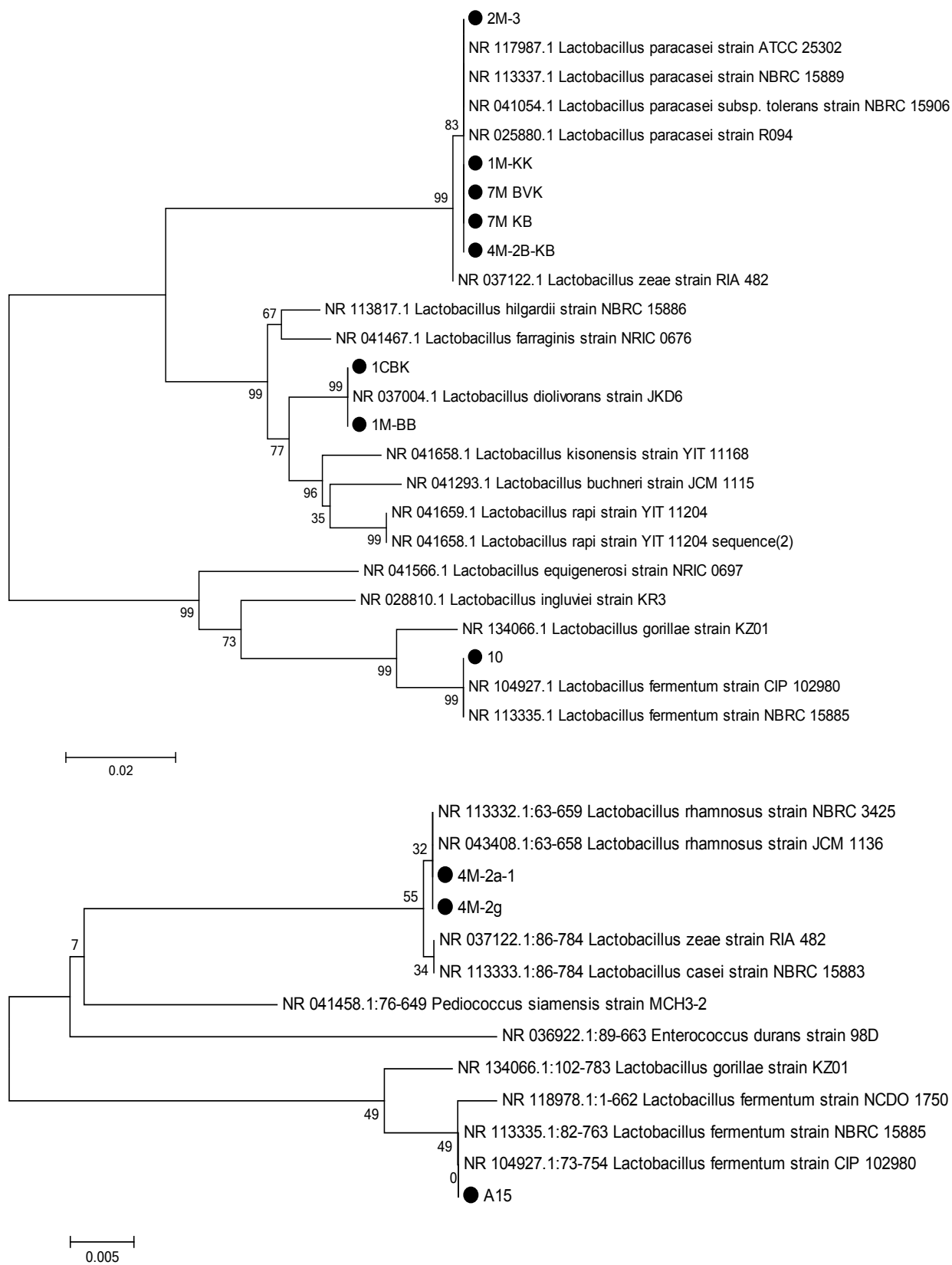


Рисунок 1 – Филогенетические древа отобранных из кумыса молочнокислых бактерий

В казахстанских и китайских образцах кумыса *L. paracasei* и *L. rhamnosus* отмечены как более часто встречающиеся [45]. Данные метагеномного исследования казахстанского кумыса Акмолинской области свидетельствуют о доминировании в образцах кумыса молочнокислых бактерий *L. diolivorans* [43].

Уровень антагонистической активности различных штаммов молочнокислых бактерий, выделенных нами из кумыса, зависел от штамма и тестовой культуры, зоны подавления роста бактериальных тестов варьировали в пределах от 10,5 до 19,5 мм. Однако средний диаметр зон подавления роста грамотрицательных бактерий *Salm. dublin* и *E. coli* выше на 21-34% у *L. fermentum*, *L. rhamnosus* и *L. paracasei* в сравнении с *L. diolivorans*.

Полученные данные согласуются с результатами исследований Agyantini с соавторами [47], которыми также была показана антагонистическая активность *L. rhamnosus* FSNN15 из ферментированного кобыльего молока против грамотрицательных бактерий *Salmonella typhimurium* LT-2, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, и *E. coli* O157.

Заключение

Таким образом, в результате исследования показана перспективность выделения новых биотехнологически и биологически ценных культур молочнокислых бактерий из ферментированного кобыльего молока (кумыса) домашнего изготовления. Отобрано 12 новых штаммов молочнокислых бактерий из видов *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* и *L. diolivorans*, проявляющих антагонистическую активность в отношении ряда бактериальных тестовых культур.

Полученные микроорганизмы будут использованы для создания столовых и профилактических напитков и продуктов с направленным действием.

Конфликт интересов. Авторы не имеют конфликтов интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта AP05132352, финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- 1 Marsh A. J., Hill C., Ross R. P., Cotter P. D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives // Trends in Food Science & Technology. – 2014. – Vol. 38. – P. 113-124.
- 2 Marco M. L., Heeney D., Binda S., Cifelli C. J., Cotter P. D., Foligne B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E. J., Hutkins R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond // Current Opinion in Biotechnology. – 2017. – Vol. 44. – P. 94-102.
- 3 Erkus O., De Jager V.C.L., Spus M, van Alen-boerrigter I.J., van Rijswijk I.M.H., Hazelwood L., Janssen P.W.M., van Hijum S.A.F.T., Kleerebezem M., Smid E.J. Multifactorial diversity sustains microbial community stability // Int Soc Microb Ecol. – 2013. – Vol. 7. P. 2126-2136.
- 4 Eussen S.J., PM, van Dongen M.C., Wijckmans N., den Biggelaar L., Oude Elferink S.J., Singh-Povel C.M., Schram M.T., Sep S.J., van der Kallen C.J., Koster A. et al. Consumption of dairy foods in relation to impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus: the Maastricht Study // Br J Nutr. – 2016. – Vol. 115(8). – P. 1453-1461.
- 5 Walsh A.M., Crispie F, Kilcawley K, O'Sullivan O, O'Sullivan MG, Claesson MJ, Cotter PD: Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir // mSystems. – 2016. – Vol. 1(5). pii: e00052-16. DOI:10.1128/mSystems.00052-16.
- 6 Hutkins R.W. Microbiology and technology of fermented Foods. 2nd Edition. – Wiley-Blackwell, 2018. – 616 p.
- 7 Ebner S., Smug L.N., Kneifel W., Salminen S.J., Sanders M.E. Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union // World J Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20. – P. 16095-16100.
- 8 Pihlanto A., Korhonen H. Bioactive peptides from fermented foods and health promotion // In: Advances in Fermented Foods and Beverages / Ed. W. Holzapfel. – Cambridge: Woodhead Publishing. – Elsevier Ltd., 2015. – P. 39-74.
- 9 Fekete A., Givens D., Lovegrove J. Casein-derived lactotriptides reduce systolic and diastolic blood pressure in a meta-analysis of randomised clinical trials // Nutrients. – 2015. Vol. 7. – P. 659-681.
- 10 Filannino P., Bai Y., Di Cagno R., Gobbetti M., Gänzle M.G. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree // Food Microbiol. – 2015. – Vol. 46. – P. 272-279.
- 11 Bai Y., Findlay B., Sanchez Maldonado A.F., Schieber A., Vederas J.C., Gänzle M.G. Novel pyrano and vinylphenol adducts of deoxyanthocyanidins in sorghum sourdough // J Agric Food Chem. – 2014. – Vol. 62. – P.11536-11546.
- 12 Senger D.R., Li D., Jaminet S.C., Cao S. Activation of the Nrf2 cell defense pathway by ancient foods: disease prevention by important molecules and microbes lost from the modern western diet // PLOS ONE. – 2016. DOI: 10.1371/ journal.pone.0148042.
- 13 Laatikainen R., Koskenpatto J., Hongisto S.M., Loponen J., Poussa T., Hillilä M., Korpela R. Randomised clinical trial: low-FODMAP rye bread vs. regular rye bread to relieve the symptoms of irritable bowel syndrome // Aliment Pharmacol Ther. – 2016. – Vol. 44. – P. 460-470.

- 14 Ziegler J.U., Steiner D., Longin C.F.H., Würschum T., Schweiggert R.M., Carle R. Wheat and the irritable bowel syndrome – FODMAP levels of modern and ancient species and their retention during bread making // *Journal of Functional Foods*. – 2016. – Vol. 25. – P. 257-266.
- 15 Iraporda C., Errea A., Romanin D.E., Cayet D., Pereyra E., Pignataro O., Sirard J.C., Garrote G.L., Abraham A.G., Rumbo M. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells // *Immunobiology*. – 2015. – Vol. 220. – P. 1161-1169.
- 16 Özer B.H., Kirmaci H.A. Functional milks and dairy beverages // *Dairy Technology*. – 2010. – Vol. 63, Issue 1. – P. 1-15.
- 17 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merestein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. – 2014. – Vol. 11. – P. 506-514.
- 18 Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. Health benefits of probiotics: a review // *ISRN Nutrition*. – 2013. -481651. DOI: 10.5402/2013/481651
- 19 Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2012. – Т. 48, №3. – С. 259-275.
- 20 Inglin R.C., Stevens M.J.A., Meile L., Lacroix C., Meile L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species // *Journal of Microbiological Methods*. – 2015. – Vol. 114. – P. 26-29.
- 21 Lee Y.K. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66 (9). – P. 3692-3697.
- 22 O'Sullivan D.J. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria // *J. Ag. Food Chem.* – 2001. – Vol. 49. – P. 1751-1760.
- 23 Greene J.D. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60. – P. 4487-4494.
- 24 Tannock G.W. Molecular assessment of intestinal microflora // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – Vol. 73. – P. 410-414.
- 25 Hunter J.O. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics // *Br. J. Nutr.* – 2002. – Vol. 88. – P. 67-72.
- 26 Caffrey N., Invik J., Waldner S.L., Ramsay D., Checkley S.L. Risk assessments evaluating foodborne antimicrobial resistance in human // *Microbial Risk Analysis*. – 2019. – Vol. 11. – P. 31-46.
- 27 Ghosh C., Sarkar P., Issa R., Haldar J. Alternatives of conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance // *Trends in Microbiology*. – 2019. – Vol. 27, No. 4. – 323-338.
- 28 Gupta R. NIAID cooperation in Eurasia region and AMR a topic of research priority // *Alternative approaches in combatting anti-microbial resistance: regional workshop*. – Almaty, 2019. – P. 7.
- 29 Garcia S.N., Osburn B.I., Cullor J.S. A one health perspective on dairy production and dairy food safety // *One Health*. – 2019. – Vol. 7. – pii: 100086.
- 30 Hoffmann V., Moser C., Saak A. Food safety in low and middle-income countries: The evidence through an economic lens // *World Development*. – 2019. – Vol. 123. – pii:104611.
- 31 Hu K., Liu J., Li B., Liu L., Gharibzahedi S. M. T., Su Y., Jiang Y., Tan J., Wang Y., Guo Y. Global research trends in food safety in agriculture and industry from 1991 to 2018: A data-driven analysis // *Trends in Food Science & Technology*. – 2019. – Vol. 85. – P. 262-276.
- 32 Nayak R., Waterson P. Global food safety as a complex adaptive system: Key concepts and future prospects // *Trends in Food Science & Technology*. – 2019. – Vol. 91. – P. 409-425.
- 33 Sharman N., Wallace C.A., Jespersen L. Terminology and the understanding of culture, climate, and behavioural change – Impact of organisational and human factors on food safety management // *Trends in Food Science & Technology*. – 2020. – Vol. 96. – P. 13-20.
- 34 Soon J.M., Brazier A.K.M., Wallace C.A. Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls 2008–2018 // *Trends in Food Science & Technology*. – 2020. – Vol. 97. – P. 76-87.
- 35 Behera S. K., Panda S. K., Kayites E., Mulaba-Bafubandi A. F. Kefir and koumiss origin, health benefits and current status of knowledge, In: *Fermented Food—Part II: Technological Interventions* / Ramesh C. Ray and Didier Montet (eds.) 2017, CRC Press, pp. 400-417.
- 36 Ranadheera C. S., Naumovski N., Ajlouni S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations, *Current Opinion in Food Science*, 2018, vol. 22, pp. 109–114.
- 37 Оразов А.Ж., Надточий Л.А., Бозымов К.К., Насамбаев Е.Г., Джумагалиева А.А. Верблюжье молоко и кисломолочные продукты на его основе как источники потенциальных пробиотических штаммов (обзор) // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал)*. – 2018. – №3. – 6с.
- 38 Айтжанова А.А., Саубенова М.Г., Мунье Дж., Олейникова Е.А., Бержанова Р. Ж. Выделение штаммов микроорганизмов из казахских кисломолочных продуктов с антагонистической активностью в отношении дрожжей рода *Candida* // *Вестник КазНУ. Сер. биологическая*. – 2019. – №2(79). – С. 54-63.
- 39 Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
- 40 Шигаева М.Х., Оспанова М.Ш. Микрофлора национальных кисломолочных напитков. – Наука. – Алма-Ата, 1983.- 151 с.
- 41 Wu R., Wang L., Wang J., Menghe B., Wu J., Guo M., Zhang H. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia // *J Basic Microbiol.* – 2009. – Vol. 49(3). – P. 318-326.

42 Hao Y., Zhao L., Zhang H., Zhai Z., Huang Y., Liu X., Zhang L. Identification of the bacterial biodiversity in koumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction // *Journal of Dairy Science*. – 2010. – Vol. 93, No. 5. – P. 1926-1933.

43 Kozhakhmetov S., Tynybayeva I., Baikhanova D., Saduakhasova S., Shakhbayeva G., Kushugulova A., Nurgozhin T., Zhumadilov Z. Metagenomic analysis of koumiss in Kazakhstan // *Cent Asian J Glob Health*. – 2014. – Vol. 3(Suppl):163. doi: 10.5195/cajgh.2014.163.

44 Dheva T., Mishra V., Kumar N., Sangu K. P. S. Koumiss: nutritional and therapeutic values // In: *Fermented Milk and Dairy Products* / Ed. A.K Puniya. – CRC Press, 2015. – P. 483-494.

45 Alexandraki V., Kazou M., Angelopoulou A., Arena M.P., Capozzi V., Russo P., Fiocco D., Spano G., Papadimitriou K., Tsakalidou E. The microbiota of non-cow milk and products // In: *Non-Bovine Milk and Milk Products*. – Academic Press, 2016. – P. 117-159.

46 Choi S.-H. Characterization of airag collected in Ulaanbaatar, Mongolia with emphasis on isolated lactic acid bacteria // *Journal of Animal Science and Technology*. – 2016. – Vol. 58: DOI 10.1186/s40781-016-0090-8.

47 Aryantini N.P., Yamasaki E., Kurazono H., Sujaya L.N., Urashima T., Fukuda K. In vitro safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk // *Anim. Sci. J.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27476815> – 2017. – Vol. 88(3). – P. 517-525.

References

1 Marsh A. J., Hill C., Ross R. P., Cotter P. D. (2014) Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives *Trends in Food Science & Technology*, vol. 38, pp. 113-124.

2 Marco M. L., Heeney D., Binda S., Cifelli C. J., Cotter P. D., Foligne B., Gañzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E. J., Hutkins R. (2017) Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 44, pp. 94–102.

3 Erkus O., De Jager VCL, Spus M, van Alen-boerriqter IJ, van Rijswijk IMH, Hazelwood L., Janssen P.W.M., van Hijum SAFT, Kleerebezem M., Smid E.J. (2013) Multifactorial diversity sustains microbial community stability. *Int Soc Microb Ecol.*, vol. 7, pp. 2126-2136.

4 Eussen S.J., PM, van Dongen M.C., Wijckmans N., den Biggelaar L., Oude Elferink S.J., Singh-Povel C.M., Schram M.T., Sep S.J., van der Kallen C.J., Koster A. (2016) et al. Consumption of dairy foods in relation to impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus: the Maastricht Study *Br J Nutr*, vol. 115(8). pp. 1453-1461.

5 Walsh A.M., Crispie F, Kilcawley K, O'Sullivan O, O'Sullivan MG, Claesson MJ, Cotter PD. (2016) Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *mSystems*, vol. 1(5). pii: e00052-16. DOI:10.1128/mSystems.00052-16.

6 Hutkins R.W. (2018) *Microbiology and technology of fermented Foods*. 2nd Edition. Wiley-Blackwell. 616 pp.

7 Ebner S., Smug L.N., Kneifel W., Salminen S.J., Sanders M.E. (2014) Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union. *World J Gastroenterol.*, vol. 20, pp. 16095-16100.

8 Pihlanto A., Korhonen H. (2015) Bioactive peptides from fermented foods and health promotion. In: *Advances in Fermented Foods and Beverages*. Ed. W. Holzapfel. Cambridge: Woodhead Publishing. Elsevier Ltd., pp. 39-74.

9 Fekete A., Givens D., (2003) Lovegrove J. Casein-derived lactotripeptides reduce systolic and diastolic blood pressure in a meta-analysis of randomised clinical trials. *Nutrients*, vol. 7, pp. 659-681.

10 Filannino P., Bai Y., Di Cagno R., Gobbetti M., Gänzle M.G. (2015) Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiol.*, vol. 46, pp. 272-279.

11 Bai Y., Findlay B., Sanchez Maldonado A.F., Schieber A., Vederas J.C., Gänzle M.G. (2014) Novel pyrano and vinylphenol adducts of deoxyanthocyanidins in sorghum sourdough. *J Agric Food Chem*, vol. 62, pp.11536-11546.

12 Senger D.R., Li D., Jaminet S.C., Cao S. (2016) Activation of the Nrf2 cell defense pathway by ancient foods: disease prevention by important molecules and microbes lost from the modern western diet. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0148042.

13 Laatikainen R., Koskenpato J., Hongisto S.M., Loponen J., Poussa T., Hillilä M., Korpela R. (2016) Randomised clinical trial: low-FODMAP rye bread vs. regular rye bread to relieve the symptoms of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.*, vol. 44, pp. 460-470.

14 Ziegler J.U., Steiner D., Longin C.F.H., Würschum T., Schweiggert R.M., Carle R. (2016) Wheat and the irritable bowel syndrome FODMAP levels of modern and ancient species and their retention during bread making. *Journal of Functional Foods.*, vol. 25, pp. 257-266.

15 Iraporda C., Errea A., Romanin D.E., Cayet D., Pereyra E., Pignataro O., Sirard J.C., Garrote G.L., Abraham A.G., Rumbo M. (2015) Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, vol. 220, pp. 1161-1169.

16 Özer B.H., Kirmaci H.A. (2010) Functional milks and dairy beverages. *Dairy Technology*, vol. 63, Issue 1. pp. 1-15.

17 Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merestein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E. (2014) Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 11, pp. 506-514.

18 Kechagia M. Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. (2013) Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, -481651. DOI: 10.5402/2013/481651

19 Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Netrusov A.I. (2012) Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria: diversity and properties (review). *Applied biochemistry and Microbiology*, vol.48(3), pp. 259-275.

- 20 Inglin R.C., Stevens M.J.A., Meile L., Lacroix C., Meile L. (2015) High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiological Method*, vol. 114, pp. 26-29.
- 21 Lee Y.K. (2000) Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl. Envir. Microbiol.*, vol. 66 (9), pp 3692-3697.
- 22 O'Sullivan D.J. (2001) Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J. Ag. Food Chem.*, vol. 49, pp. 1751-1760.
- 23 Greene J.D. (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl. Envir. Microbiol.*, vol. 60, pp. 4487-4494.
- 24 Tannock G.W. (2001) Molecular assessment of intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* vol.73. pp. 410-414.
- 25 Hunter J.O. (2002) A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br. J. Nutr.*, vol. 88, pp. 67-72.
- 26 Caffrey N., Invik J., Waldner S.L., Ramsay D., Checkley S.L. (2019) Risk assessments evaluating foodborne antimicrobial resistance in human. *Microbial Risk Analysis.*, vol. 11, pp. 31-46.
- 27 Ghosh C., Sarkar P., Issa R., Haldar J. (2019) Alternatives of conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology*, vol. 27, No. 4. pp. 323-338.
- 28 Gupta R. (2019) NIAID cooperation in Eurasia region and AMR a topic of research priority. *Alternative approaches in combatting anti-microbial resistance: regional workshop.* Almaty, p. 7.
- 29 Garcia S.N., Osburn B.I., Cullor J.S. (2019) A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health*, vol. pii: 100086.
- 30 Hoffmann V., Moser C., Saak A. (2019) Food safety in low and middle-income countries: The evidence through an economic lens. *World Development*, vol. 12, pii:104611.
- 31 Hu K., Liu J., Li B., Liu L., Gharibzahedi S. M. T., Su Y., Jiang Y., Tan J., Wang Y., Guo Y. (2019) Global research trends in food safety in agriculture and industry from 1991 to 2018: A data-driven analysis. *Trends in Food Science & Technology.*, vol. 85, pp. 262-276.
- 32 Nayak R., Waterson P. (2019) Global food safety as a complex adaptive system: Key concepts and future prospects. *Trends in Food Science & Technology.*, vol. 91, pp. 409-425.
- 33 Sharman N., Wallace C.A., Jespersen L. (2020) Terminology and the understanding of culture, climate, and behavioural change – Impact of organisational and human factors on food safety management. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 96, pp. 13-20.
- 34 Soon J.M., Brazier A.K.M., Wallace C.A. (2008-2018) Determining common contributory factors in food safety incidents – A review of global outbreaks and recalls. *Trends in Food Science & Technology.*, vol. 97, pp. 76-87.
- 35 Behera S. K., Panda S. K., Kayites E., Mulaba-Bafubiandi A. F. (2017) Kefir and koumiss origin, health benefits and current status of knowledge, In: *Fermented Food—Part II: Technological Interventions* Ramesh C. Ray and Didier Montet (eds.) CRC Press, pp. 400-417.
- 36 Ranadheera C. S., Naumovski N., Ajlouni S. (2018) Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations, *Current Opinion in Food Science.*, vol. 22, pp. 109–114.
- 37 Orazov A. Zh., Nadochiy L. A., Bozymov K.K., Nasambaev E.G., Dzhumagalieva A.A. (2018) Camel milk and fermented milk products based on it as sources of potential probiotic strains (review). *Bulletin of the Orenburg scientific center of Uro RAS (electronic journal).*, vol. 3, pp.6.
- 38 Aitghanova A.A., Saubenova M.G., Munye J., Oleynikova E.A., Berzhanova R.J. (2019) Isolation of strains of microorganisms from Kazakh fermented milk products with antagonistic activity against yeast of the genus *Candida*. *VestnikKazNU. Ser. Biological.*, vol. 2 (79), pp. 54-63.
- 39 Glanc S. (1998) *Medico-biological statistics. Per. from the English.*- Moscow: Praktika, pp.459.
- 40 Shigaeva M.Kh., Ospanova M.Sh. (1983) *Microflora of national fermented milk drinks.* Science. Alma-Ata, pp. 151.
- 41 Wu R., Wang L., Wang J., Menghe B., Wu J., Guo M., Zhang H. (2009) Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *J Basic Microbiol.*, vol. 49(3), pp. 318-326.
- 42 Hao Y., Zhao L., Zhang H., Zhai Z., Huang Y., Liu X., Zhang L. (2010) Identification of the bacterial biodiversity in koumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no. 5, pp. 1926-1933.
- 43 Kozhakhmetov S., Tynybayeva I., Baikhanova D., Saduakhasova S., Shakhbayeva G., Kushugulova A., Nurgozhin T., Zhumadilov Z. (2014) Metagenomic analysis of koumiss in Kazakhstan. *Cent Asian J Glob Health*, vol. 3(Suppl):163. doi: 10.5195/cajgh.2014.163.
- 44 Dheva T., Mishra V., Kumar N., Sangu K. P. S. (2015) Koumiss: nutritional and therapeutic values. In: *Fermented Milk and Dairy Products*, Edition: Chapter: 18, Publisher: Boca Raton, FL: CRC Press., Editors: A.K Puniya, pp.483-494.
- 45 Alexandraki V., Kazou M., Angelopoulou A., Arena M.P., Capozzi V., Russo P., Fiocco D., Spano G., Papadimitriou K., Tsakalidou E. (2016) The microbiota of non-cow milk and products. In: *Non-Bovine Milk and Milk Products.* Academic Press, pp. 117-159.
- 46 Choi S. (2016) H.Characterization of airag collected in Ulaanbaatar, Mongolia with emphasis on isolated lactic acid bacteria. *Journal of Animal Science and Technology*, vol. 58: DOI 10.1186/s40781-016-0090-8.
- 47 Aryantini N.P., Yamasaki E., Kurazono H., Sujaya I.N., Urashima T., Fukuda K. (2017) In vitro safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. *AnimSci J.*, vol. 88(3), pp. 517-525.

3-бөлім
ИММУНОЛОГИЯ

Section 3
IMMUNOLOGY

Раздел 3
ИММУНОЛОГИЯ

Е.О. Остапчук¹ , **Ж.Е. Мухатаев^{1,2}** , **Ю.В. Перфильева¹** 

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Казахстан, г. Алматы

²Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы,
e-mail; katyostapchuk@gmail.com

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ВИТИЛИГО

Витилиго – это кожное заболевание, характеризующееся потерей меланоцитов и формированием очагов депигментации кожи. Хотя точная этиология и патогенез витилиго до сих пор остаются до конца не изученными, известно, что в основе патогенеза витилиго лежат аутоиммунные механизмы. Как и при большинстве аутоиммунных патологий, активно обсуждается роль дисфункции иммуносупрессорных Т-регуляторных (Treg) клеток при витилиго. Предполагается, что сниженная иммуносупрессорная активность и инфильтрация Treg-клетками пораженных участков кожи играет ключевую роль в срыве иммунной толерантности, ведущей к развитию витилиго. Однако, фенотипические и функциональные характеристики Treg-клеток при витилиго остаются малоизученными. Целью данного исследования было изучение фенотипа циркулирующих Treg-клеток при витилиго. В ходе исследования было обнаружено, что по сравнению со здоровыми добровольцами в периферической крови больных прогрессирующей формой витилиго достоверно снижена доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, а также доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих иммуносупрессорный маркер CD39 и маркер клеточной адгезии и миграции CD44. У людей с ремиссией витилиго также было обнаружено снижение доли Treg-клеток с фенотипом CD39⁺ и CD44⁺FoxP3⁺ по сравнению с контролем, что может говорить о роли Treg-клеток в патогенезе витилиго и о снижении функциональной активности и рекрутирования Treg-клеток в область поражения витилиго, что может приводить к отсутствию надлежащего иммунологического надзора.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, витилиго, CD39, CD44.

Y.O. Ostapchuk¹, Z. Mukhatayev^{1,2}, Y.V. Perfilyeva¹

¹M.A. Aitkhozhin's Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Kazakhstan, Almaty

²Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty,
e-mail: katyostapchuk@gmail.com

Phenotypical analysis of circulating T-regulatory cells in vitiligo patients

Vitiligo is an autoimmune skin disease characterized by the loss of melanocytes and development of skin depigmentation foci. The exact etiology and pathogenesis of vitiligo are not fully understood, but autoimmune processes have been strongly implicated in the development of the disease. As with other autoimmune diseases, the role of dysfunction of immunosuppressive T-regulatory (Treg) cells in Vitiligo has been actively discussed. It is assumed that reduced immunosuppressive activity and Treg cell infiltration of vitiligo-affected skin lesions play a key role in a breakdown of immune tolerance leading to the development of the disease. However, the phenotypic and functional characteristics of Treg cells in vitiligo remain poorly understood. The aim of this study was to investigate the phenotype of circulating Treg cells in vitiligo. It was found that the proportion of CD4⁺CD25⁺ Treg cells, as well as the proportion of CD4⁺CD25⁺ Treg cells expressing the immunosuppressive marker CD39 and the cell adhesion and migration marker CD44, were significantly reduced in the peripheral blood of vitiligo patients with active stage of the disease comparing to healthy volunteers. Moreover, we found a decreased proportion of Treg cells possessing CD39⁺ and CD44⁺FoxP3⁺ phenotypes in patients with stable vitiligo. Obtained data suggest that Treg cells play an important role in vitiligo pathogenesis and may indicate a decrease in the functional activity and the recruitment of Treg cells into vitiligo lesions leading to a lack of immunological surveillance.

Key words: T regulatory cells, vitiligo, CD39, CD44.

Е.О. Остапчук¹, Ж.Е. Мухатаев^{1,2}, Ю.В. Перфильева¹

¹М.А.А йтхожин атындағы молекулярлық биология және биохимия институты, Қазақстан, Алматы қ.

²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.,
e-mail: katyostapchuk@gmail.com

Витилиго науқастарының перифериялық қанындағы Т-реттегіш жасушаларына фенотиптік талдау

Витилиго – бұл меланоциттердің жоғалуымен және терінің депигментациясы ошақтарының пайда болуымен сипатталатын тері ауруы. Витилигоның нақты этиологиясы мен патогенезі әлі де толық ашылмағанымен, витилиго патогенезінің негізі аутоиммунды механизм арқылы екендігі белгілі. Көптеген аутоиммундық патологиялардағыдай, иммуносупрессивті Т-реттегіш (Treg) жасушаларының дисфункциясының витилигодағы рөлі қазіргі таңда белсенді талқыланады. Иммуносупрессиялық белсенділіктің төмендеуі және зардап шеккен тері аймақтарындағы Treg жасушаларының санының аздығы витилигоның дамуына әкелетін иммундық төзімділікті бұзуда маңызды рөл атқарады деп болжанады. Алайда, витилиго құрамындағы Treg жасушаларының фенотиптік және функционалдық сипаттамалары нашар түсініледі. Бұл зерттеудің мақсаты витилиго құрамындағы Treg жасушаларының фенотипін зерттеу болды. Зерттеу көрсеткендей, үдемелі витилиго формасы бар пациенттердің перифериялық қанында сау еріктілермен салыстырғанда, CD4⁺ CD25⁺ Treg жасушаларының үлесі, сонымен қатар CD39 иммуносупрессивті маркерін білдіретін CD4⁺CD25⁺ Treg жасушаларының үлесі және CD44 жасушаларының адгезиясы мен миграциялық маркері айтарлықтай төмен. Витилиго ремиссиясымен ауыратын адамдарда Treg жасушаларының CD39⁺ және CD44⁺ FoxP3⁺ фенотиптері бақылауға қарағанда төмен екені және бұл витилиго патогенезіндегі Treg жасушаларының рөлін және функционалды белсенділіктің төмендеуін және Treg жасушаларын витилиго зақымдану аймағына жалдауды көрсетіп тиісті иммунологиялық қадағалаудың болмауына әкелуі мүмкін.

Түйін сөздер: Т реттегіш жасушалар, витилиго, CD39, CD44.

Введение

Витилиго представляет собой кожное заболевание, которое относят к гипомеланозам. Заболевание развивается в среднем у 1-2% населения, у лиц обоих полов, любой расы и примерно в половине случаев проявляется в возрасте до 20 лет. Хотя витилиго можно считать заболеванием, наносящим незначительный вред здоровью, люди с витилиго часто страдают серьезными эмоциональными и психологическими расстройствами, связанными с чувством стресса, смущения, низкой самооценки, особенно в профессиональной и общественной сферах. Кроме этого, депигментация может способствовать получению пациентами солнечных ожогов и развитию рака кожи, а также потери слуха и развитию воспалений радужной оболочки глаз [1].

Витилиго было идентифицировано как аутоиммунное заболевание, опосредованное аутореактивными CD8⁺ Т-клетками, реагирующими на меланосомный антиген – тирозиназу, антиген меланомы MART-1, меланосомный трансмембранный протеин (MelanA), gp100 и другие белки, экспрессируемые меланоцитами, что приводит к цитотоксическому ответу и депигментации кожи [2, 3]. Ранее было показано, что у пациентов, страдающих витилиго, доля циркулирующих меланоцит-специфичных CD8⁺ Т-клеток

значительно повышена по сравнению со здоровыми людьми и коррелирует с площадью очагов поражения кожи. Т-клетки при витилиго в большей степени экспрессируют молекулы, обеспечивающие хоуминг клеток в дерму, включая экспрессию кожного лимфоцитарного антигена (CLA) и кожного Т-клеточного хемоаттрактанта (STACK) [4]. Также, у пациентов с активными формами витилиго наблюдается повышенная инфильтрация Т-клеток на периферии очагов депигментации кожи [5], а также повышение уровня продукции цитокинов Th1-типа на периферии и непосредственно в очагах депигментации [6]. При этом, в экспериментах с использованием мышинной модели витилиго было показано, что удаление CD8⁺ Т-клеток предотвращает массовую гибель меланоцитов, тогда как повышение доли этих клеток усиливает депигментацию [2]. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в исследовании патофизиологии витилиго за последнее десятилетие, точные механизмы, лежащие в основе активации, расширения пула аутореактивных CD8⁺ Т-клеток и потери толерантности к аутоантигенам меланоцитов при витилиго, до сих пор не ясны [7].

Как и в случае других аутоиммунных патологий, в качестве одной из основных причин срыва иммунной толерантности при витилиго рассматривают отклонения в функционирова-

нии Т-регуляторных клеток (Treg), играющих ключевую роль в регуляции иммунного ответа и контролирующей иммунный ответ на собственные и чужеродные антигены, тем самым предотвращая развитие аутоиммунных нарушений [8]. Treg-клетки созревают в тимусе из незрелых CD4⁺CD8⁺ тимоцитов в ходе нормального биогенеза Т-лимфоцитов и, после выхода на периферию, участвуют в обеспечении периферической иммунологической толерантности. [9]. Treg-клетки находят в периферической крови и вторичных лимфоидных органах по их конститутивной экспрессии маркеров CD4 и CD25 [10]. В качестве дополнительного маркера Treg-клеток, определяют внутриклеточный транскрипционный фактор FoxP3, являющийся ДНК-связывающим белком, который необходим для дифференцировки и функционирования Treg-клеток [11].

Основными клетками-мишенями иммуносупрессорного действия Treg-клеток являются CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, отвечающие на аутоантиген. Treg-клетки подавляют активацию, пролиферацию и продукцию цитокинов аутоантиген-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами через подавление ко-стимуляции дендритными клетками, абсорбции IL-2, а также при непосредственном межклеточном взаимодействии и посредством продукции супрессорных цитокинов и цитотоксических белков. При межклеточном контакте Treg-клетки могут убивать Т-клетки с помощью гранзим-зависимого или перфорин-зависимого механизмов или подавлять их пролиферацию и продукцию IL-2 через индукцию внутриклеточного циклического АМР, катализируемого CD39 (экто-нуклеозидтрифосфатдифосфогидролазой) и CD73 (экто-5'-нуклеотидазой), экспрессируемых Treg-клетками [12], а также через иммуносупрессорные молекулы, экспрессированные на мембране Treg-клеток, индуцируемый глюкокортикоидами TNF-подобный рецептор (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor, GITR), пептид латентности (latency-associated peptide, LAP) и антиген-4 цитолитических Т-лимфоцитов (cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CTLA-4) [13]. К иммуносупрессорным цитокинам, продуцируемым Treg-клетками и подавляющим активность Т-лимфоцитов, относят трансформирующий фактор роста-β (transforming growth factor-beta, TGF-β), IL-35 и IL-10 [14].

Недавно проведенные исследования показали роль Treg-клеток в развитии витилиго, однако малочисленные данные до сих пор не позволяют сделать заключение относительно того, в чем

именно заключается дисфункция Treg-клеток, в изменении количества образующихся Treg-клеток, аномалий в их функциональной активности или их способности адгезии и хоуминга в кожные покровы. Так, было показано, что Treg-клетки способны регулировать активность меланоцит-специфичных CD8⁺ Т-клеток посредством CTLA-4 *in vitro*, при этом меланоцит-специфичные CD8⁺ Т-клетки у пациентов с витилиго обладают фенотипом, характерным для Т-клеток не подвергшихся иммуносупрессии Treg-клетками [15]. Репигментация кожи у мышей наблюдается при повышении инфильтрации Treg-клеток спонтанных эпидермальных очагов депигментации [16]. Также, супрессорный эффект Treg-клеток больных витилиго снижен в отношении антиген-специфичной пролиферации CD8⁺ Т-клеток [17, 18], что указывает на их важную роль в предотвращении продолжающегося иммунного ответа против меланоцитов. Однако, в настоящее время, результаты исследований доли циркулирующих или инфильтрирующих очаги депигментации Treg-клеток и их функциональной активности у пациентов с витилиго носят спорный характер. Результаты некоторых исследований показали значительное снижение доли Treg-клеток и экспрессии ими FoxP3, тогда как другие исследователи не обнаружили изменений в количестве циркулирующих CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток. При этом, доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, инфильтрирующих периферические участки и непосредственно очаги депигментации витилиго значительно снижена [19]. Однако, достоверных изменений в экспрессии рецепторов хоуминга CCR4, CCR5, CCR8 и CLA Treg-клетками периферической крови больных витилиго не было обнаружено. Treg-клетки, выделенные из периферической крови больных витилиго, были в равной степени способны мигрировать в направлении дермальных лигандов CCR4 и хемокина CCL22, что и Treg-клетки здоровых доноров [20].

В связи с этим, мы исследовали долю Treg-клеток и экспрессию ими функциональных маркеров и рецептора хоуминга трансмембранного гликопротеина I типа CD44 периферической крови больных витилиго.

Материалы и методы

В ходе исследования использовали венозную кровь здоровых доноров (ср. возраст 34,5±9,6 лет (26-51), n=8; женщины: ср. возраст 42,3±12,5 лет, n=3; мужчины: ср. возраст

29,8±3,0 лет, n=5), не имеющих аутоиммунных заболеваний или явных признаков других заболеваний, и людей с активными и неактивными формами витилиго (средний возраст – 23,7±7,4 лет (18-31), n=7; женщины: ср. возраст 21,0±1,4 лет, n=2; мужчины: ср. возраст 25,4±4,7 лет, n=5), характеристики больных витилиго доно-

ров представлены в таблице 1. Исследование было одобрено локальной этической комиссией Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина. Все доноры дали информированное согласие, исследование проводилось согласно этическим принципам Хельсинской Декларации.

Таблица 1 – Характеристики больных витилиго, участвующих в исследовании

№ п./п.	Пол	Возраст	Продолжительность заболевания	Течение заболевания	Клиническая форма
1	Муж.	26	17 лет	Ремиссия (8 лет)	Локализованная форма (поражение 4% кожного покрова)
2	Муж.	26	9 лет	Ремиссия (5 лет)	Локализованная форма (поражение 5% кожного покрова)
3	Жен.	22	15 лет	Прогрессирующее	Генерализованная форма (поражение 30-40% кожного покрова)
4	Муж.	31	1,5 мес.	Прогрессирующее	Локализованная форма (поражение 1% кожного покрова)
5	Жен.	20	6 лет	Прогрессирующее	Локализованная форма (поражение 2% кожного покрова)
6	Муж.	26	9 лет	Ремиссия (5 лет)	Локализованная форма (поражение 5% кожного покрова)
7	Муж.	18	11 лет	Прогрессирующее	Локализованная форма (поражение 10% кожного покрова)

Из цельной крови выделяли мононуклеарные клетки центрифугированием на Histopaque-1,077 (Sigma-Aldrich, США) 20 мин при 3000g, 20°C и отмывали средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США). Далее фенотип и экспрессию супрессорных молекул оценивали методом проточной цитофлуориметрии, анализируя Treg-клетки в гейте CD4⁺CD25⁺ (рис. 1). Для этого клетки метили флуоресцентно-мечеными антителами к CD4-PE, CD39-APC, CTLA4-APC, IL10-FITC, GITR-APC, CD73-APC, LAP(TGFβ1)-APC, TGFβ1-PE, FoxP3-APC (Miltenyi Biotec, США), CD4-FITC, CD25-PerCP-Cy5.5, FoxP3-PE, CD44-FITC (BD Biosciences, США), IL35-APC (R&D Systems, США). Сначала проводили мечение поверхностных маркеров, согласно инструкциям фирм-производителей, затем клетки фиксировали, пермеабелизовали и отмывали с использованием набора FOXP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec, США), далее производили внутриклеточное окрашивание и анализировали с использованием цитофлуориметра FACSCalibur и программного обеспечения BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, США).

Полученные данные обрабатывали методами математической статистики. Графики содержат информацию в виде средних арифметических величин ± стандартного отклонения. Достоверность различия *p* рассчитывали по критерию Стьюдента (Ттест). Различие двух сравниваемых выборок считали достоверным при уровне значимости *p*<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

На сегодняшний день в литературе имеются разногласия относительно изменения доли CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток периферической крови при витилиго [19]. Мы изучили данные популяции в группе здоровых доноров и больных витилиго. В ходе исследования нами было обнаружено, что в группе больных витилиго значительно снижена доля циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток по сравнению с группой здоровых доноров, при этом достоверных различий в доли CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток периферической крови между данными группами доноров обнаружено не было (рис. 1).

При сравнении доли CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток периферической крови между контрольной группой и группой больных витилиго с прогрессирующей формой заболевания, мы также обнаружили достоверное снижение количества данных клеток в при прогрессирующем витилиго (9,0±1,6 (n=8), 6,4±0,04 (n=4), p=0,003, соответственно). Доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток периферической крови не отличалась между группами здоровых доноров и больных витилиго с неактивной формой заболевания и между группами больных с прогрессирующей и неактивной формами витилиго (9,0±1,6 (n=8), 8,2±1,3 (n=3), p=0,4; 6,4±0,04 (n=4), 8,2±1,3 (n=3), p=0,1, соответственно) (данные не показаны). Уровень экспрессии FoxP3 Treg-клетками не отличался до-

стоверно между всеми исследуемыми группами (данные не показаны).

Полученные нами результаты противоречат ранее опубликованным данным, согласно которым доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих FoxP3, снижена в периферической крови больных с прогрессирующим витилиго по сравнению со здоровыми людьми и больными с неактивной формой заболевания [21]. Однако полученные нами данные свидетельствуют о том, что количество циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток коррелирует с прогрессированием витилиго и подтверждают роль недостаточности данных клеток в срыве иммунологической толерантности и патогенезе витилиго.

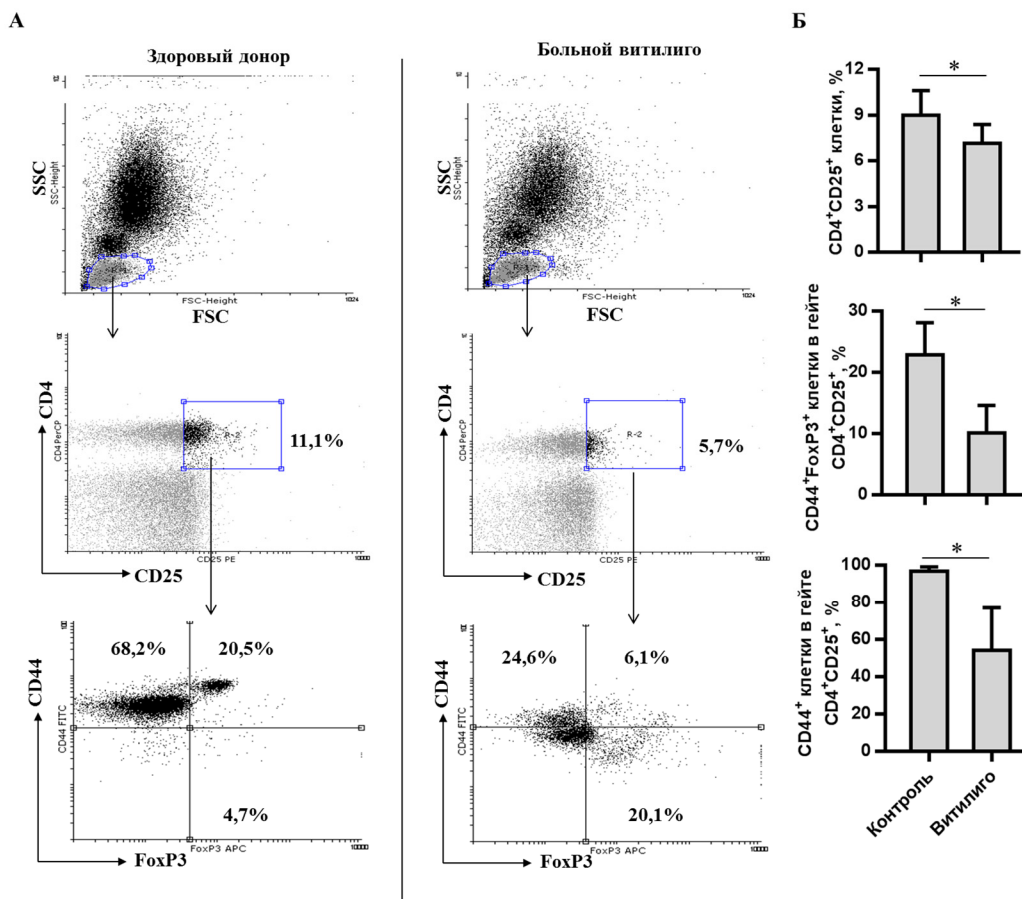


Рисунок 1 – Доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD44⁺FoxP3⁺ и CD44⁺, периферической крови здоровых доноров (Контроль) и больных витилиго (Витилиго).

Представлены репрезентативные (А) и обобщенные данные в виде M±SD (Б), достоверность различий между группами представлена как *p<0,05 (по критерию Стьюдента)

Известно, что доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, инфильтрирующих очаги депигментации витилиго, значительно снижена, что считается основ-

ной причиной отсутствия регуляции аутоиммунного отмета против меланоцитов [22, 23]. Тем не менее, в ранее проведенных исследованиях

попытки выявить причины снижения тропности Treg-клеток в пораженные участки дермы, не увенчались успехом. В частности, не было обнаружено отклонений в экспрессии рецепторов адгезии и хоуминга CCR4, CCR5, CCR8 и CLA Treg-клетками периферической крови при витилиго [20]. Однако, экспрессия одного из центральных рецепторов привлечения Treg-клеток из кровяного русла в места воспаления – CD44 [24] при витилиго ранее не изучалась. Таким образом, следующим этапом нашего исследования было изучение экспрессии CD44 CD4⁺CD25⁺ Treg-клетками периферической крови больных прогрессирующей и неактивной формами витилиго.

В ходе исследования нами было обнаружено, что доля циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD44, достоверно снижена в группе больных витилиго по сравнению со здоровыми добровольцами. Более того, процент CD44⁺FoxP3⁺-клеток в гейте CD4⁺CD25⁺ также был значительно снижен в группе больных, по отношению к контрольной группе (рис. 1). Аналогичные данные были получены в отношении доли CD44⁺ и CD44⁺FoxP3⁺ Treg-клеток при сравнении контрольной группы с группой больных прогрессирующей формой витилиго (96,9±2,3 (n=8), 46,3±26,3 (n=4), $p=0,03$; 22,9±5,2 (n=8), 7,8±4,6 (n=4), $p=0,001$, соответственно). Доля CD44⁺FoxP3⁺ CD4⁺CD25⁺-клеток также была значительно выше в периферической крови здоровых доноров по сравнению с донорами с неактивной формой витилиго (96,9±2,3 (n=8), 13,3±2,5 (n=3), $p=0,003$, соответственно). Достоверных отличий в уровне экспрессии CD44 CD4⁺CD25⁺-клетками между группой здоровых доноров и больных неактивной формой витилиго, а также экспрессии CD44 CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клетками между группами больных прогрессирующей и неактивной формами витилиго обнаружено не было (данные не показаны).

Таким образом, экспрессия рецептора хоуминга CD44 Treg-клетками периферической крови при витилиго снижается. Мы можем предположить, что данная дисфункция Treg-клеток может приводить к снижению тропности Treg-клеток в дерму очагов витилиго. Более того, ранее в исследованиях на мышах было показано, что экспрессия CD44 положительно коррелирует с экспрессией Foxp3, продукцией IL-10, повышенной пролиферацией и супрессорной активностью Treg-клеток в отношении пролиферации T-клеток [25]. Способность связывать

компонент межклеточного матрикса – гиалуронан, активными изоформами CD44 дискриминирует Treg-клетки с повышенным супрессорным потенциалом и степенью активации [26]. Также ранее было показано, что Treg-клетки мышей с отсутствием гена, кодирующего CD44, обладают сниженной способностью подавления T-клеточного иммунитета [27]. Мы можем предположить, что снижение доли Treg-клеток, экспрессирующих CD44, при развитии витилиго свидетельствует об уменьшении пула Treg-клеток способных эффективно подавлять активность меланоцит-специфичных CD8⁺ T-клеток у пациентов.

Далее мы сравнили уровень экспрессии функциональных маркеров Treg-клетками периферической крови больных витилиго и здоровых доноров. Нами не было выявлено значимых различий в доли CD4⁺CD25⁺ и CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg-клеток, экспрессирующих маркеры CTLA-4, IL-10, GITR, CD73, LAP, TGFβ и IL-35, между исследуемыми группами (данные не показаны). Однако мы обнаружили достоверное понижение уровня экспрессии CD39 CD4⁺CD25⁺ Treg-клетками периферической крови больных витилиго по отношению к здоровым донорам (рис. 2). Кроме того, доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD39, была достоверно выше в группе здоровых доноров при сравнении с группой больных, страдающих прогрессирующей и неактивной формой витилиго (81,8±22,2 (n=8), 35,6±16,3 (n=4), $p=0,01$; 42,6±21,4 (n=3), $p=0,04$, соответственно). Отличий в экспрессии CD39 CD4⁺CD25⁺ Treg-клетками между группами больных прогрессирующей и неактивной формой витилиго обнаружено не было (данные не показаны).

Как было отмечено выше, экспрессия CD39 ассоциирована с супрессорной активностью Treg-клеток и каталитическая инактивация поверхностного АТФ молекулой CD39 является одним из ключевых иммуносупрессорных механизмов Treg-клеток [28]. CD39 гидролизует как аденозинтрифосфат, так и аденозиндифосфат до монофосфата [29]. Связывание аденозина с его A2A-рецептором, который представлен на мембране эффекторных T-клетках и дендритных клеток, приводит к увеличению внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата и подавлению функции этих клеток. Существуют экспериментальные данные о том, что супрессия пролиферации T-клеток мышей, нокаутных по A2A гену, намного ниже, чем у диких мышей. Трансдукция гена *foxp3* в мышинные CD25⁺

Т-клетки индуцирует экспрессию ими CD39, а предварительная инкубация Treg-клеток в АТФ-содержащей среде снижает АТФ-зависимое созревание DC при дальнейшей их ко-инкубации. Помимо прямого супрессорного эффекта, уда-

ление АТФ с цитоплазматической мембраны клеток молекулой CD39 позволяет Treg-клеткам проникать в области воспаления и подавлять АТФ-индуцированные воспалительные реакции [30].

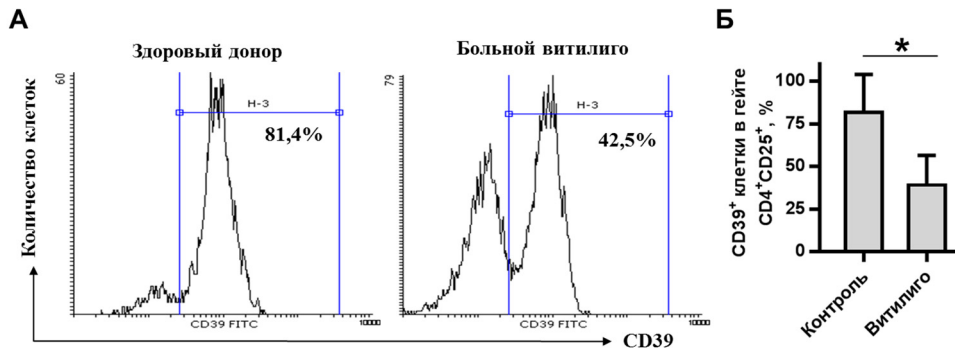


Рисунок 2 – Доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих CD39, в периферической крови здоровых доноров (Контроль) и больных витилиго (Витилиго). Представлены репрезентативные (А) и обобщенные данные в виде M±SD (Б), достоверность различий между группами представлена как * p<0,05 (по критерию Стьюдента)

Поскольку полученные нами данные свидетельствуют о снижении экспрессии супрессорной молекулы CD39 Treg-клетками при прогрессирующем витилиго и при ремиссии заболевания, мы можем предположить вклад дисфункции Treg-клеток в патогенез витилиго. Снижение тропности и экспрессии CD39 Treg-клетками может приводить к неконтролируемому повышению количества и активации меланоцит-специфичных Т-клеток и их аутоиммунному цитотоксическому действию в очагах витилиго.

Заключение

В результате проведенного исследования мы установили, что доля общей популяции CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, а также доля CD4⁺CD25⁺ Treg-клеток, экспрессирующих иммуносупрессорную молекулу CD39 и рецептор клеточной адгезии и миграции CD44, снижены в периферической крови у больных витилиго, страдающих прогрессирующей формой заболевания. Также было установлено, что у больных вити-

лиго, находящихся на стадии ремиссии, также снижена доля Treg-клеток с фенотипом CD39⁺ и CD44⁺FoxP3⁺ по сравнению с контролем. Полученные данные указывают на дисфункцию Treg-клеток при витилиго и могут свидетельствовать о снижении их иммуносупрессорных свойств и способности эффективно мигрировать в очаги депигментации, что может приводить к неконтролируемой активности меланоцит-специфичных Т-клеток и прогрессии заболевания.

Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов нарушения иммунной регуляции при витилиго и могут послужить основой для разработки новых подходов к лечению витилиго на основе повышения супрессорной активности Treg-клеток и их рекрутирования в пораженные витилиго участки кожи.

Работа выполнена в рамках гранта AP05131691 “Молекулярные механизмы влияния Т-регуляторных клеток на активность опухолевых клеток” Комитета Науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.




Литература

- 1 Pandve, H.T. "Vitiligo: is it just a dermatological disorder?" *Indian J. Dermatol.* 53, no. 1 (2008): 40-41.
- 2 van den Boorn, J.G., Konijnenberg, D., Dellempijn, T.A., et al. "Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients." *J. Invest. Dermatol.* 129, no. 9 (2009): 2220-2232.
- 3 Ogg, G.S., Rod Dunbar, P., Romero, P., Chen, J.L., Cerundolo, V. "High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo." *J. Exp. Med.* 188, no. 6 (1998): 1203-1208.
- 4 Strassner, J.P., Harris, J.E. "Understanding mechanisms of autoimmunity through translational research in vitiligo." *Curr. Opin. Immunol.* 43, (2016): 81-88.
- 5 Le Poole, I.C., van den Wijngaard, R.M., Westerhof, W., Das, P.K. "Presence of T cells and macrophages in inflammatory vitiligo skin parallels melanocyte disappearance." *Am. J. Pathol.* 148, no. 4 (1996): 1219-1228.
- 6 Le Poole, I.C., Stennett, L.S., Bonish, B.K., et al. "Expansion of vitiligo lesions is associated with reduced epidermal CDw60 expression and increased expression of HLA-DR in perilesional skin." *Br. J. Dermatol.* 149, no. 4 (2003): 739-748.
- 7 Ujiie, H. "Regulatory T cells in autoimmune skin diseases." *Exp. Dermatol.* 28, no. 6 (2019): 642-646.
- 8 Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M. "Regulatory T cell and immune tolerance." *Cell.* 133, no. 5 (2008): 775-787.
- 9 Taams, L.S., Akbar, A.N. "Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293, (2005): 115-131.
- 10 Ballke, C., Gran, E., Baekkevold, E.S., Jahnsen, F.L. "Characterization of Regulatory T-Cell Markers in CD4+ T Cells of the Upper Airway Mucosa." *PLoS One.* 11, no. 2 (2016): e0148826.
- 11 Allan, S.E., Alstad, A.N., Merindol, N., et al. "Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of FOXP3." *Mol. Ther.* 16, no. 1 (2008): 194-202.
- 12 Nishikawa, H., Sakaguchi, S. "Regulatory T cells in tumor immunity." *Int. J. Cancer.* 127, (2010): 759-767.
- 13 Galdino, N.A.L., Loures, F.V., Araújo, E.F., et al. "Depletion of regulatory T cells in ongoing paracoccidioidomycosis rescues protective Th1/Th17 immunity and prevents fatal disease outcome." *Sci. Rep.* 8, (2018): e16544.
- 14 Vignali, D.A., Collison, L.W., Workman, C.J. "How regulatory T cells work." *Nat. Rev. Immunol.* 8, (2008): 523-532.
- 15 Maeda, Y., Nishikawa, H., Sugiyama, D., et al. "Detection of self-reactive CD8+ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals." *Science.* 346, (2014): 1536-1540.
- 16 Eby, J.M., Kang, H.K., Klarquist, J., et al. "Immune responses in a mouse model of vitiligo with spontaneous epidermal de- and repigmentation." *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, no. 6 (2014): 1075-1085.
- 17 Lili, Y., Yi, W., Ji, Y., et al. "Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo." *PLoS One.* 7, (2012): e37513.
- 18 Ben Ahmed, M., Zaraq, I., Rekik, R., et al. "Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo." *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, (2012): 99-109.
- 19 Dwivedi, M., Kemp, E.H., Laddha, N.C., et al. "Regulatory T cells in vitiligo: Implications for pathogenesis and therapeutics." *Autoimmun Rev.* 14, no. 1 (2015): 49-56.
- 20 Klarquist, J., Denman, C.J., Hernandez, C., et al. "Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo." *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, no. 2 (2010): 276-286.
- 21 Dwivedi, M., Laddha, N.C., Arora, P., Marfatia, Y.S., Begum, R. "Decreased regulatory T-cells and CD4(+)/CD8(+) ratio correlate with disease onset and progression in patients with generalized vitiligo." *Pigment Cell Melanoma Res.* 26, (2013): 586-591.
- 22 Abdallah, M., Lotfi, R., Othman, W., Galal, R. "Assessment of tissue FoxP3+, CD4+ and CD8+ T-cells in active and stable nonsegmental vitiligo." *Int. J. Dermatol.* 53, (2014): 940-946.
- 23 Ono, S., Tanizaki, H., Otsuka, A., et al. "Coexistent skin lesions of vitiligo and psoriasis vulgaris. Immunohistochemical analyses for IL-17A-producing cells and regulatory T cells." *Acta Derm. Venereol.* 94, (2014): 329-330.
- 24 DeGrendele, H.C., Estess, P., Picker, L.J., Siegelman, M.H. "CD44 and its ligand hyaluronate mediate rolling under physiologic flow: a novel lymphocyte/endothelial cell primary adhesion pathway." *J. Exp. Med.* 183, (1996): 1119-1130.
- 25 Campbell, D.J., Koch, M.A. "Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells." *Nat. Rev. Immunol.* 11, no. 2 (2011): 119-130.
- 26 Firan, M., Dhillon, S., Estess, P., Siegelman, M.H. "Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44." *Blood.* 107, no. 2 (2006): 619-627.
- 27 Tang, Q., Henriksen, K.J., Bi, M., et al. "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." *J. Exp. Med.* 199, (2004): 1455-1465.
- 28 Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., et al. "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." *Blood.* 110, (2007): 1225-1232.
- 29 Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., et al. "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." *J. Exp. Med.* 204, (2007): 1257-1265.
- 30 Shevach, E.M. "Mechanisms of FOXP3 T regulatory cell-mediated suppression." *Immunity.* 30, (2009): 636-45.

4-бөлім
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

Section 4
**MOLECULAR
BIOLOGY AND GENETICS**

Раздел 4
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

С.М. Бармак^{1,2} , **А.Б. Бердыгалиев²**, **Ю.А. Синявский²**,
А.А. Серикбай^{1,2} , **И.С. Савицкая¹** , **Т.Ш. Шарманов²**,
И.Х. Менденхалл³, **Е.В. Жолдыбаева⁴**

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Казахская академия питания, Казахстан, г. Алматы

³Медицинская школа Duke-NUS, Малайзия, г. Сингапур

⁴Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Астана, e-mail: sabyr95@mail.ru

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК *SALMONELLA ENTERICA*

Для улучшения клинической и лабораторной диагностики сальмонеллеза наиболее перспективным является практическое применение методов молекулярно-генетической диагностики и прежде всего полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволит обнаруживать ДНК на ранних стадиях заболевания. Целью данной работы является разработка ПЦР метода для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica*, определение чувствительности и специфичности разработанного метода. Диагностический метод на основе классической ПЦР позволит с высокой точностью в короткие сроки выявлять возбудитель сальмонеллеза и может быть использован для контроля и мониторинга распространения данной инфекции на территории Республики Казахстан.

Одним из основных компонентов ПЦР являются олигонуклеотидные праймеры. При разработке метода ПЦР для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica* нами конструированы праймеры – S Inv -1F и S Inv -1R. Разработанный ПЦР метод отличается высокой специфичностью и чувствительностью (10 микробных клеток/мл) и позволяет выявлять ДНК бактерии *Salmonella enterica* в пробе за 3–4 часа. Результаты представленных исследований указывают на возможность использования полимеразной цепной реакции для обнаружения ДНК бактерии *Salmonella enterica* в образцах из чистой культуры, а также в биологическом материале. Информативность ПЦР была показана при анализе пищевых продуктов, что в реальных условиях позволяет выявить возбудителя бактерий *Salmonella enterica* на ранних стадиях заражения. Создание отечественной ПЦР тест-системы, адаптированной к *Salmonella enterica*, циркулирующей на территории Казахстана, может использоваться в разработке мероприятий по улучшению эпидемиологической и эпизоотической обстановки по сальмонеллезной инфекции.

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, ДНК, ПЦР, специфичность, чувствительность.

S.M. Barmak^{1,2}, A.B. Berdygaliyev², Yu.A. Sinyavskiy², A.A. Serikbay^{1,2},
I.S. Savitskaya¹, T.Sh. Sharmanov², I.H. Mendenhall³, E.V. Zholdybayeva⁴

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

²"Kazakh academy of nutrition" LLP, Kazakhstan, Almaty

³Duke-NUS Medical school, Malaysia, Singapore

⁴National center for biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan, e-mail: sabyr95@mail.ru

Development of PCR method for *Salmonella enterica* DNA identification

To improve the clinical and laboratory diagnosis of salmonellosis, the most promising is the practical application of molecular genetic diagnostic methods and, first of all, polymerase chain reaction (PCR), which will allow DNA to be detected in the early stages of the disease. The aim of this work is to develop a PCR method for detecting the DNA of *Salmonella enterica* bacteria, determining the sensitivity and specificity of the developed method. The creation of a diagnostic method based on classical PCR will make it possible to quickly identify the causative agent of salmonellosis with high accuracy and can be used to control and monitor the spread of this infection in the Republic of Kazakhstan.

One of the main components of PCR are oligonucleotide primers. When developing a PCR method for detecting the DNA of the *Salmonella enterica* bacterium, we designed primers S Inv -1F and S Inv -1R. The developed PCR method is highly specific and sensitive (10 microbial cells / ml) and allows the DNA of *Salmonella enterica* bacteria to be detected in a sample in 3–4 hours. The results of the

presented studies indicate the possibility of using the polymerase chain reaction to detect the DNA of the bacterium *Salmonella enterica* in samples from a pure culture, as well as in biological material. The informativeness of PCR was shown in the analysis of food products, which in real conditions can make it possible to detect the causative agent of the bacterium *Salmonella enterica* in the early stages of infection. The creation of a domestic PCR test system adapted to *Salmonella enterica* circulating in Kazakhstan can be used in the development of measures to improve the epidemiological and epizootic conditions for salmonella infection.

Key words: *Salmonella enterica*, DNA, PCR, specificity, sensitivity.

С.М. Бармак^{1,2}, А.Б. Бердығалиев², Ю.А. Синявский², А.А. Серикбай^{1,2},
И.С. Савицкая¹, Т.Ш. Шарманов², И.Х. Менденхалл³, Е.В. Жолдыбаева⁴

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Қазақ тағамтану академиясы, Қазақстан, Алматы қ.

³Медициналық мектеп Duke-NUS, Малайзия, Сингапур қ.

⁴Ұлттық биотехнология орталығы, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ., e-mail: sabyr95@mail.ru

***Salmonella enterica* ДНҚ-сын анықтауға арналған ПТР әдісін дамыту**

Сальмонеллездің клиникалық және зертханалық диагнозын жақсарту үшін молекулярлық-генетикалық диагностика әдістерін практикалық қолдану ең перспективалы болып табылады, әсіресе полимеразды тізбекті реакция (ПТР), ол ДНҚ-ны аурудың ерте сатысында анықтауға көмектеседі. Бұл жұмыстың мақсаты – *Salmonella enterica* бактерияларының ДНҚ-сын анықтау үшін ПТР әдісін жасау, әзірленген әдістің сезімталдығы мен ерекшелігін анықтау. Классикалық ПТР негізінде диагностикалық әдісті құру сальмонеллез қоздырғышын жоғары дәлелдігімен тез анықтауға мүмкіндік береді және оны Қазақстан Республикасында осы инфекцияның таралуын бақылау үшін қолдануға болады.

ПТР негізгі компоненттерінің бірі, ол олигонуклеотидті праймерлер болып табылады. *Salmonella enterica* бактериясының ДНҚ-сын анықтаудың ПТР әдісін жасау кезінде S Inv -1F и S Inv -1R праймерлері жасалынды. Әзірленген ПТР әдісі өте ерекше және сезімтал (10 микробтық жасуша / мл). Ол *Salmonella enterica* бактерияларының ДНҚ-сын 3-4 сағат ішінде анықтауға мүмкіндік береді. Ұсынылған зерттеулердің нәтижелері полимеразды тізбекті реакцияны *Salmonella enterica* бактериясының ДНҚ-сын таза культуралар үлгілерінде, сондай-ақ биологиялық материалда анықтау үшін қолдану мүмкіндігін береді. ПТР-нің ақпараттылығы тағам өнімдерін талдауда көрсетілген, бұл нақты жағдайда, инфекцияның ерте сатысында *Salmonella enterica* бактериясының қоздырғышын анықтауға мүмкіндік береді. ПТР отандық тестілеу жүйесін Қазақстанда таралған сальмонеллездің эпидемиологиялық және эпизоотиялық жағдайларын жақсарту бойынша, шараларды жасау кезінде қолдануға болады.

Түйін сөздер: *Salmonella enterica*, ДНҚ, ПТР, ерекшелігі, сезімталдық.

Введение

Быстрая идентификация бактериальных штаммов необходима для эффективной диагностики инфекционных заболеваний и в настоящее время имеет особую актуальность. Это связано с циркуляцией возбудителей во внешней среде и периодическими эндемическими вспышками заболеваний [1, 2, 3, 4].

В результате изменения социальных условий общества (широкий обмен продуктов питания, миграция населения и т.д.) число заболеваний сальмонеллезной этиологией возросло во всех странах мира. В то же время увеличилось количество сероваров сальмонелл. Возбудитель сальмонеллеза существует в природе из-за постоянно происходящего эпизоотологического процесса у различных животных и птиц. [5, 6].

При определенных социально-экономических условиях, способствующих реализации определенного механизма передачи возбудителей, сальмонелла также может поражать людей; они могут длительное время циркулировать среди людей, особенно в детских больницах, в случае нарушения санитарно-гигиенического и дезинфекционного режима [7, 8].

Информация о распространенности сальмонелл среди различных видов животных чрезвычайно многочисленна. Практически нет ни одного вида животных, от которого при тщательном исследовании не выделили бы сальмонеллы. Однако не все из них являются эквивалентными источниками инфекции для человека. Наибольшее значение в распространении сальмонеллеза принадлежит сельскохозяйственным животным и птице [9, 10].

Непрерывность технологического процесса получения птицеводческой продукции, концентрация большого числа особей приводит к резкому возрастанию так называемого микробного давления, что является следствием создания благоприятных условий для возникновения болезней, в том числе и сальмонеллеза [11, 12].

Бактерии рода *Salmonella spp.* широко распространены в окружающей среде и, соответственно, в пищевом сырье. Заражение этими патогенами наиболее употребляемых продуктов питания зачастую является основным источником заражения детей [13,14]. Знание эпидемиологической ситуации патогенов в цепи производства пищевых продуктов и правильные профилактические мероприятия по контролю патогенов позволяют уменьшить риск и количество заболеваний детей. Научные эпидемиологические исследования, проведенные в Соединённом Королевстве Великобритании и Северной Ирландии, Финляндии и других странах, в том числе в Российской Федерации, подтверждают факт, что патогенные микроорганизмы широко распространены в цепи производства пищевых продуктов [15, 16]. Основная проблема состоит в том, что контроль качества продуктов крупных производителей осуществляется более регулярно и детально, что нельзя сказать о контроле качества продуктов мелких производителей [17, 18].

Человек заражается сальмонеллой при употреблении в пищу продуктов, которые обсеменены сальмонеллами в процессе их получения, обработки, транспортировки и продажи, которые подверглись недостаточному приготовлению или хранились с нарушением установленных режимов [19,20]. Отсюда следует, что определяющими факторами передачи возбудителей инфекции при сальмонеллезах являются пищевые продукты.

Целью данной работы является разработка ПЦР метода для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica* и определение чувствительности и специфичности разработанного метода.

Материалы и методы

Объекты исследования. В качестве объекта исследований в нашей работе использовали бактериальные штаммы: *Salmonella enterica* Virchow; *Salmonella enterica* Enteritidis; *Salmonella enterica* Typhimurium. Идентификацию микроорганизмов проводили по общепринятой методике по МУ 4.2.2723–10 «Лабораторная диагно-

стика сальмонеллезом, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды». Для определения специфичности ПЦР метода нами были использованы ДНК бактериальных штаммов *Mycoplasma pneumoniae*; *Mycoplasma mycoides* var. *Capri*, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida* из коллекции микроорганизмов РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» и биологические образцы продуктов питания – рыба, куриные яйца, творог, куриный фарш, йогурт, мясо утки, куриное мясо.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из чистой культуры бактерии *Salmonella enterica* и биологических образцов продуктов питания, методом основанным на сорбции ДНК на тонкодисперсной двуокиси кремния.

К 450 мкл лизирующего раствора (1.25 мМ – гуанидина тиоцианата, 50 мМ – ЭДТА, 24.5 мМ – TrisHCl, 0,0013 н – HCl) добавили по 100 мкл гомогенизированного исследуемого образца. Перемешали на вортексе в течение 15 сек, и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Добавили 450 мкл изопропанола и тщательно перемешали. Далее добавили 10 мкл 6% суспензии двуокиси кремния, еще раз перемешали на вортексе 15 сек и инкубировать при комнатной температуре 10 мин. Центрифугировали пробирки для осаждения сорбента двуокиси кремния при 15 тыс. об/мин в течение 1 мин. Далее удалили надосадочную жидкость. Добавили в каждую пробирку по 500 мкл промывочного раствора (25 % – изопропанола, 103 мМ – NaCl, 10.4 мМ – TrisHCl, 0,000017 н – HCl) и на вортексе в течение 15 сек. Далее центрифугировали при максимальной скорости 30 сек, и удалили надосадочную жидкость. Повторили отмывку промывочным раствором. Добавили 500 мкл 75 % этанола. Перемешали на вортексе в течение 15 сек, затем центрифугировали при максимальной скорости в течение 30 сек. Удалили надосадочную жидкость, далее пробирки поместили в термостат при температуре 65 °С на 10-15 мин для подсушивания сорбента двуокиси кремния. При этом крышки пробирок должны быть открыты. В пробирки добавили по 50 мкл элюента, перемешали и инкубировали при 65 °С в течение 10 мин. Центрифугировали пробы при максимальной скорости 2 мин. Надосадочную жидкость, содержащую ДНК использовали для постановки ПЦР.

Конструирование праймеров.

Для подбора специфичных праймеров для выявления бактерии *Salmonella enterica* нами

был выбран ген *Inv* генома бактерии *Salmonella enterica*. Поиск, анализ и отбор нуклеотидных последовательностей гена *Inv* бактерии *Salmonella enterica* проводили в международной базе данных GenBank (CP051269, CP050716, AP020330, CP048775, CP050783). Анализ нуклеотидных последовательностей гена *Inv* осуществляли с помощью компьютерной программы Vector NTI Suite 10. При выборе праймеров S *Inv* -1F (прямой) и S *Inv* -1R (обратный) использовали следующие требования: длина праймеров 17-28 нуклеотидов; процентное содержание G+C пар – 40-60; избегать залипания праймеров самого на себя; образования димеров; температура плавления в пределах 52-59 °C [19,20,21].

Разработанные праймеры специфичны к бактериям *Salmonella enterica* (CP051269, CP050716, AP020330, CP048775, CP050783) и отсутствие перекрестной реакции с бактериями других видов, таких как *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides var. Capri*, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida* осуществляли с помощью программного обеспечения «BLASTn» (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, NCBI) и ПЦР.

ПЦР-амплификация. Получение ПЦР-фрагментов гена *Inv* бактерии *Salmonella* проводили с использованием праймеров: S *Inv* -1F (прямой) и S *Inv* -1R (обратный). Амплификацию специфических участков ДНК проводили в термоциклере Эппендорф.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (1 мкг/мл), при напряженности поля 6 В/см².

Результаты электрофореза учитывали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Результаты реакции выявляются в виде светящихся полос. Положительными (ДНК *Salmonella enterica*) считаются пробы, в которых полосы в геле располагаются точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы положительных контролей. При выявлении *Salmonella enterica* наблюдали полосу ДНК размером 500 п.о. В отрицательном контроле не должно выявляться никакие полосы. Деионизированную воду использовали в качестве отрицательного контроля.

Результаты и обсуждения

Конструирование праймеров для выявления ДНК бактерии *Salmonella enterica*

Гены, расположенные в области *Inv* имеются у штаммов всех подвидов *Salmonella enterica*. Анализ филогенетических деревьев, построенных на основе последовательностей гена *Inv*, показывает, что эта область хромосомы сальмонелл была приобретена сальмонеллами в результате горизонтального переноса еще до дифференциации на серовары внутри *Salmonella enterica*, а не в результате последующего переноса между штаммами различных сероваров, поэтому характерные мутации локализованных в гене можно считать генетическими маркерами сероваров [22, 23].

Характеристики синтезированных праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики синтезированных праймеров для выявления бактерии *Salmonella enterica*

Праймеры	Последовательность праймеров	Длина	T _{плав}	Позиция в геноме	содержание GC-пар	Размер продукта
S <i>Inv</i> -1F (прямой)	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG	22	58,1	269 – 291	50 %	500 п.о.
S <i>Inv</i> -1R (обратный)	ATCGCCATTTACGCGGGTCA	20	59,8	748 – 768	55 %	

Согласно таблице 1, расчетный размер ПЦР-продукта, получаемый при помощи созданной пары праймеров для выявления бактерии *Salmonella enterica*, составляет 500 п.о.

Зондирование гомологии для выбранных праймеров проводили поисковой системой BLASTn на веб-сайте (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, NCBI). Результаты анализа праймеров представлены в таблице 2.

Компьютерная программа BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast/>), подтвердила специфичность праймеров S *Inv* -1F и S *Inv* -1R. Показано, что праймеры обозначенные нами S *Inv* -1F (прямой) и S *Inv* -1R (обратный) специфичны к участку гена *Inv* бактерии *Salmonella enterica* на 100 %. Эти данные являются важным условием для использования специфичных праймеров в дальнейшей работе.

Таблица 2 – Анализ праймеров *Salmonella enterica* с использованием программы BLASTn

Штаммы <i>Salmonella enterica</i>	Идентификационный номер в Генбанке	Идентичность, %
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Goldcoast strain R18.0877 chromosome, complete genome	CP037960.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar 4.f5l.12: i – L-3841 DNA. complete genome	AP019375.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar 4.f5l.12: i – L-3833 DNA. complete genome	AP019374.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Kentucky strain K13SKQ02 chromosome	CP037917.1	100
<i>Salmonella enterica</i> strain FSW0104 chromosome, complete genome	CP037894.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain CFSANQ87304 chromosome, complete genome	CP037892.1	100
<i>Salmonella enterica</i> strain FDA00009424 chromosome, complete genome	CP037891.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Montevideo str. 42N chromosome, complete genome	CP037893.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Montevideo str. USDA-ARS-USMARC-1913 chromosome, complete genome	CP025278.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain USDA-ARS-USMARC-60984 chromosome, complete genome	CP025276.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Newport str. USDA-ARS-USMARC-1923 chromosome, complete genome	CP025273.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain USDA-ARS-USMARC-60983 chromosome, complete genome	CP025280.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-0153 InvA (invA) gene, complete cds	MK017941.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-9020 InvA (invA) gene, complete cds	MK017940.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-7977 InvA (invA) gene, complete cds	MK017939.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-9562 InvA (invA) gene, complete cds	MK017937.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-5370 InvA (invA) gene, complete cds	MK017936.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-1295 InvA (invA) gene, complete cds	MK017935.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R9-Q007 InvA (invA) gene, complete cds	MK017934.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-7983 InvA (invA) gene, complete cds	MK017933.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain FSL R8-5224 InvA (invA) gene, complete cds	MK017932.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Stanley strain so wt8 chromosome, complete genome	CP036167.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain so wt7 chromosome, complete genome	CP036168.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Brancaster strain so ww281 chromosome, complete genome	CP036166.1	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Albany strain so wt5 chromosome, complete genome	CP036165.1	100

Экспериментальные работы по определению состава реакционной ПЦР смеси, а также по подбору оптимальных температурно-временных параметров амплификации позволили отработать условия постановки ПЦР.

Для амплификации ДНК бактерии *Salmonella enterica* использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, состоящая из:

х10 ПЦР буфер	- 2,5 мкл
dNTP mix 10 мМ	- 1 мкл
MgCl ₂	- 2 мкл
Праймер S Inv -1F (20 пмоль)	- 1 мкл
Праймер S Inv -1R (20 пмоль)	- 1 мкл
ДНК <i>Salmonella enterica</i>	- 3 мкл
Тақ ДНК полимеразы (5 Ед)	- 0,5 мкл
Деионизированная вода	до 25 мкл

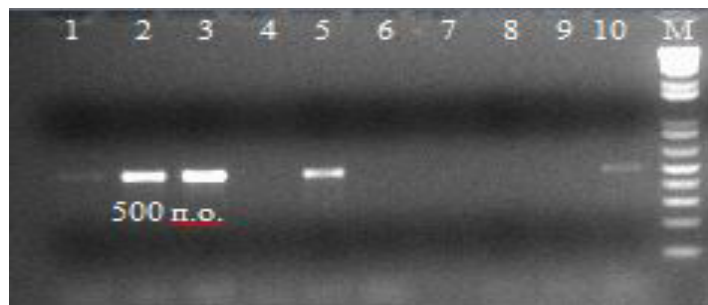
В процессе проведения экспериментов по подбору оптимальных температур и параметров времени для проведения ПЦР при *Salmonella enterica* нами был выбран следующий режим:

пре-денатурация, 94 °С – 5 мин
денатурация, 94 °С – 30 сек
отжиг 57 °С – 30 сек 35 циклов
репликация, 72 °С – 1 мин
пост-репликация, 72 °С – 7 мин

При положительном результате реакции после разделения ПЦР продукта в агарозном геле в присутствии бромистого этидия проявляется полоса размером 500 п.о. Отсутствие или наличие полосы ДНК другого размера говорит об отрицательном результате.

При разработке амплификационного ПЦР метода для оценки аналитической специфичности и чувствительности праймеров осуществлена серия экспериментов с использованием ДНК бактерии *Salmonella enterica*.

Определение специфичности ПЦР метода. Проведен опыт по определению специфичности ПЦР метода. Использованы материалы *Salmonella enterica* Virchow, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* var. Capri, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida*. При постановке ПЦР в качестве положительного контроля использована ДНК *Salmonella enterica* Enteritidis. В качестве отрицательного контроля использована деионизированная вода. Полученные результаты представлены на рисунке 1.



1 – *Salmonella enterica* Virchow; 2 – *Salmonella enterica* Enteritidis;
3 – *Salmonella enterica* Typhimurium; 4 – *Mycoplasma pneumoniae*;
5 – *Salmonella enterica* Enteritidis; 6 – *Mycoplasma mycoides* var. capri;
7 – *Clostridium perfringens*; 8 – *Pasteurella multocida*;
9 – Отрицательный контроль (H₂O); 10 – Положительный контроль –
Salmonella enterica Enteritidis; М – маркер ДНК, 1 kb «Invitrogen».

Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации при определении специфичности ПЦР метода для выявления *Salmonella enterica*

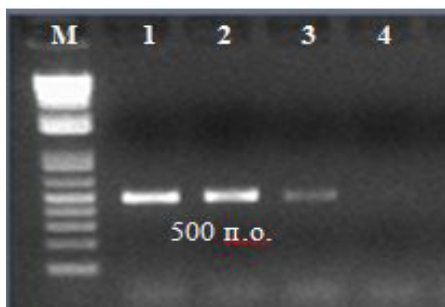
При определении специфичности метода ПЦР для выявления *Salmonella enterica* было установлено, что во всех пробах, содержащих ПЦР продукты *Salmonella enterica* (пробы №1, №2, №3, №5, положительный контроль – №10) наработаны специфические ПЦР продукты размером 500 п.о. Отрицательные результаты были

получены при использовании в качестве матриц ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma mycoides* var. Capri, *Clostridium perfringens*, *Pasteurella multocida*.

Определение чувствительности ПЦР метода. При определении чувствительности ПЦР метода использованы отработанные оп-

тимальные температурно-временные условия реакции. Для определения чувствительности использована бактериальная суспензия

Salmonella enterica от 1000 до 1 микробных клеток/мл. Полученные результаты представлены на рисунке 2.



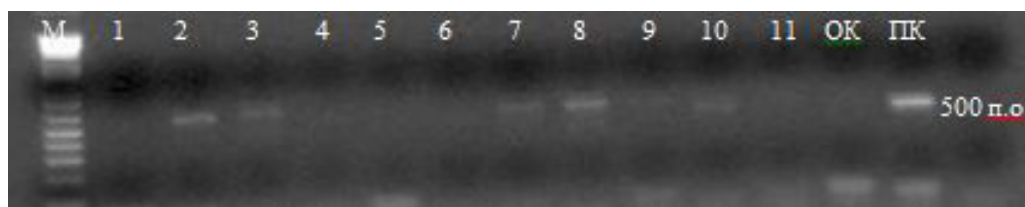
М – маркер ДНК «1 kb DNA Ladder, Invitrogen»;
Использованы ДНК, выделенные из бактериальных суспензий *Salmonella enterica*:
1 – 1000 микробных клеток/мл; 2 – 100 микробных клеток/мл;
3 – 10 микробных клеток/мл; 4 – 1 микробных клеток/мл.

Рисунок 2 – Определение чувствительности тест-системы для выявления *Salmonella enterica* методом ПЦР

В результате проведенных экспериментов минимальный порог чувствительности реакции амплификации, при котором происходила детекция ДНК всех штаммов бактерии *Salmonella enterica* с помощью праймеров S Inv -1F и S Inv -1R, составил 10 микробных клеток/мл.

Для оценки возможности применения праймеров в целях выявления бактерии *Salmonella enterica* использованы ДНК, выделенные из биологических образцов продуктов питания.

Результаты представлены на рисунке 3.



1 – рыба; 2 – куриные яйца 1; 3 – куриные яйца 2; 4 – творог; 5 – куриный фарш; 6 – йогурт;
7 – куриные яйца 3; 8 – куриные яйца 4; 9 – мясо утки; 10 – куриное мясо; 11 – рыба продукт;
ОК – отрицательный контроль; ПК – положительный контроль.

Рисунок 3 – Выявление ДНК бактерии *Salmonella enterica* в продуктах питания методом ПЦР

В результате работы установлено, что праймеры S Inv -1F и S Inv -1R способны детектировать ДНК *Salmonella enterica* в зараженных сальмонеллезом куриных яйцах (пробы №2, №3, №7 и №8), в мясе утки (№9) и в курином мясе (№10).

Таким образом, в результате проделанной работы бактерии *Salmonella enterica* идентифицированы в шести биологических образцах продуктов питания.

В последнее время по данным литературы [24] с наибольшей частотой сальмонеллы обна-

руживаются в мясе птицы (тушках и желудках цыплят-бройлеров; курином фарше, печени, голени и крылышках; голени и сердце индейки) – 31,43%, рыбе (сазан, лещ, судак и сельдь) – 13,16% и яйцах – 10% (рисунок 4).

По уровню контаминации сальмонеллами продукты питания можно расположить в следующем порядке: птица – рыба – яйца – мясо – колбасы – молочные продукты – овощи. Заражение сальмонеллезом может произойти при употреблении контаминированного молока, тер-

мически необработанных куриных яиц, инфицированных до снесения, а также продуктов, приготовленных из них. Другой фактор передачи – недостаточно обработанное мясо птицы, говядины, свинины. Поэтому необходимо строго соблюдать санитарно-гигиенические правила про-

дажи, приготовления и потребления пищевых продуктов. Опасность таится не только в самом присутствии сальмонелл в продуктах питания, но и в наличии в пище продуктов их жизнедеятельности, которые и являются причиной токсикоинфекции.

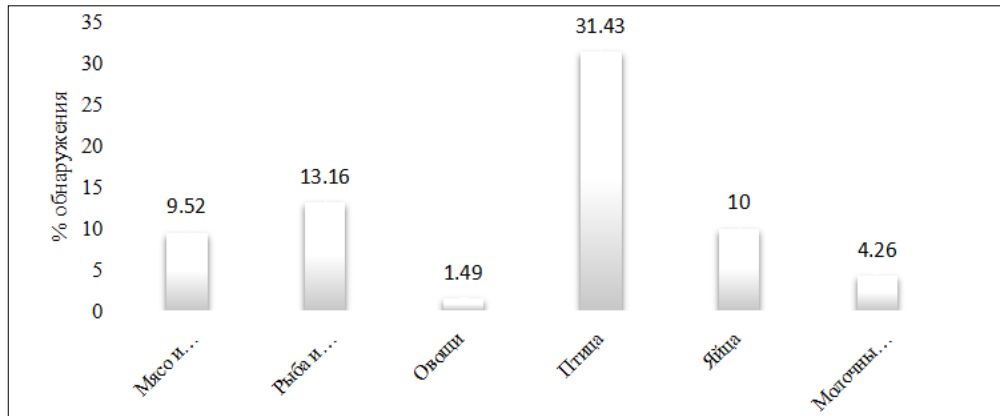


Рисунок 4 – Частота обнаружения сальмонелл в продуктах питания (%)

Эффективные стратегии профилактики на протяжении всей пищевой цепи от фермы до потребителя являются наиболее действенными средствами производства безопасных пищевых продуктов. FAO и ВОЗ призывают страны к созданию программ контроля на протяжении всей пищевой цепи и к использованию таких систем, которые позволяют осуществлять меры контроля в точке наибольшей эффективности, в том числе в секторе первичного производства [25,26,27].

Необходимо отметить, что успех борьбы с бактериальными заболеваниями в большой степени зависит от своевременного обнаружения и идентификации возбудителей. В настоящее время существует достаточно много методических подходов, позволяющих решить эту проблему. Это и классические методы бактериологии, и иммунохимические методы, и молекулярно-биологические методы тестирования, получающие все более широкое распространение благодаря быстрому развитию биотехнологической науки.

Для диагностики и идентификации сальмонеллеза к настоящему времени в мире разработаны и применяются различные серологические и иммунологические методы [28, 29, 30]. Все эти методы имеют различную диагностическую ценность – одни из них требуют значительных затрат времени, другие имеют низкую чувствительность и специфичность. Поэтому усо-

вершенствование и разработка более чувствительных и специфичных, а также экспрессных методов лабораторной диагностики остается актуальной проблемой и до настоящего времени.

Заключение

Разработаны праймеры для обнаружения ДНК *Salmonella enterica* на основе гена *Inv* и выявлена их эффективность при идентификации культур и обнаружении ДНК *Salmonella enterica* в пробах из чистой культуры, а также в биологическом материале.

Разработанный метод ПЦР для выявления *Salmonella enterica* может быть использован для установления диагноза при исследовании продуктов питания.

Разработанный метод ПЦР для выявления бактерии *Salmonella enterica* обладает высокой специфичностью и чувствительностью (10 микробных клеток/мл) и может использоваться для выявления возбудителя сальмонеллеза.

Работа выполнена в рамках проекта грантового финансирования «Генотипирование патогенных микроорганизмов в пищевом сырье и продуктах питания, реализуемых на рынках и супермаркетах Республики Казахстан, разработка рекомендаций для снижения риска заболеваемости детей дошкольного и школьного возраста», 2018–2020 гг., № AP05131147.

Литература

- 1 Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова О.Б., Борисенкова А.Н., Белаш Д.Э., Яковлев А.Ф. Эффективный молекулярно-генетический метод идентификации штаммов сальмонелл и протей // Доклады российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – №5. – С. 60-63
- 2 Жебрун А.Б., Мукомолов С.А., Нарвская О.В. Генотипирование и субтипирование патогенных микроорганизмов в развитии технологий эпидемиологического надзора // Медицинский академический журнал. – 2009. – №4. – С. 59-67.
- 3 Terletskiy, V., Tyshchenko, V., Martinez-Ballesteros, I., Garaizar, J., & Bikandi, J. Validation of double digest selective label database for sequenced prokaryotic genomes. *Bioinformatics*. – (2009). – 26(3). – 417–418.
- 4 Терлецкий В.П., Тыщенко В.И., Новикова И.И., Бойкова И.В., Тюлебаев С.Д., Шахтамиров И.Я. Эффективный метод генетической паспортизации штаммов *Bacillus subtilis* – перспективных продуцентов биопрепаратов // Микробиология – 2016. – Т. 85 №1.- С. 50-55.
- 5 Korenberg, E. I. Natural focaloty of infections: Current problems and prospects of research. *Biology Bulletin*. – 2010. – 37(7). – 665–676.
- 6 Maunsell, F., & Donovan, G. A. Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* -2008 – 24(1). 155–190.
- 7 Костенко Ю.Г., Храмов М.В., Давлеев А.Д. Проблема пищевого сальмонеллеза в России: объективный взгляд и пути решения // Все о мясе. – 2012. – №1. – С. 34-37
- 8 Парфенчик И.В., Цыркунов В.М., Васильев А.В., Богданович Т.И. Лечение и санация больных сальмонеллезом, вызванным штаммами *S. infantis* и *S. Mission* // Рецепт. – 2010. – №5. – С. 82-91
- 9 Мезенцев С.В., Разумовская В.В., Распространение сальмонелл в продукции животноводства // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014 №7, С. 118-125
- 10 N. Starodub, J. Ogorodnjchuk Efficiency of immune biosensor based on total internal reflection ellipsometry at the determination of *Salmonella* // 14th International Meeting on Chemical Sensors – IMCS 2012 P. 884 – 887
- 11 Салаутин В.В. Пагоморфология и дифференциальная диагностика сальмонеллеза птиц, вызванного различными серовариантами возбудителя: авт. дис. ... докт. вет. наук. – Саратов, 2004. – 28 с.
- 12 Чугунова Е.О., Татарникова Н.А., Прохорова Т.С., Мауль О.Г. Зараженность сальмонеллами продукции птицеводства // Современные проблемы науки и образования, – 2014, №6 С. 18-23
- 13 Scharff R. L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection* 2012, 75:123-131.
- 14 Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556.
- 15 Alali W. Q., Gaydashov R., Petrova E., Panin A., Tugarinov O., Kulikovskii A., Mamleeva D., Walls I., Doyle M. P. Prevalence of *Salmonella* on retail chicken meat in Russian Federation. *Journal of Food Protection* 2012, 75:1469-73.
- 16 Lay K. S., Vuthy Y., SongP., Phol K., Sarthou J.L. Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* serovars and *Campylobacter* spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. *Journal of Veterinary Medical Science* 2011, 73:325-329.
- 17 Old D. C., Chisholm S. A., Crichton P. B., Taylor A. Grouping of *Salmonella enterica* serotype Montevideo strains by ribotyping and IS200 profiling. *Epidemiology and Infection* 2000, 124:375-382.
- 18 Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Moraes, P. M., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), 175–180.
- 19 Е.О. Чугунова, Н.А. Татарникова, Определение бактерий рода *Salmonella* в мясе и мясных полуфабрикатах // Пермский аграрный вестник – 2013, №1 С. 41-44
- 20 Ручнова О.И., Куркина Е.С. Биологические свойства изолятов бактерий рода *Salmonella* // Евразийский союз ученых, – 2014 №30-1 С. 11-14
- 21 Кригер О.В., Солдатова Л.С., Кравченко А.Ю., Новоселова М.В. Основные аспекты конструирования праймеров для определения видовой принадлежности ДНК крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2.
- 22 Norgeo, J. L., Ardura, A., Pola, I. G., Martinez, J. L., & Garcia-Vazquez, E. (2012). Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 354–361.
- 23 Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979–986.
- 24 Стрелков А.А. Разработка ускоренного иммунологического метода индикации сальмонелл в продовольственном сырье и кормах. Автореферат кандидата биологических наук по ВАК РФ 06.02.05, 2011, Москва.
- 25 Яцышина С.Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами. Автореферат кандидата биологических наук по ВАК РФ 16.00.03, 2003, Москва.
- 26 Отчет «Генотипирование патогенных микроорганизмов в пищевом сырье и продуктах питания, реализуемых на рынках и супермаркетах Республики Казахстан, разработка рекомендаций для снижения риска заболеваемости детей дошкольного и школьного возраста.

27 EFSA. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of Salmonella in holdings of laying hen flocks of Gallus gallus. Parma, Italy: EFSA, 21February 2007. Available at: http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/report_finlayinghens.html

28 Snow, L. C., Davies, R. H., Christiansen, K. H., Carrique-Mas, J. J., Cook, A. J. C., & Evans, S. J. (2010). Investigation of risk factors for Salmonella on commercial egg-laying farms in Great Britain, 2004-2005. *Veterinary Record*, 166(19), 579–586.

29 CARRIQUE-MAS, J. J., BRESLIN, M., SNOW, L., McLAREN, I., SAYERS, A. R., & DAVIES, R. H. (2008). Persistence and clearance of different Salmonella serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection*, 137(06), 837.

30 Gunn, J. S., Marshall, J. M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R. C., & Ryan, E. T. Salmonella chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence // *Trends in Microbiology*, – 2014 22(11), 648–655.

References

1 Terleckij V.P., Tyshchenko V.I., Novikova O.B., Borisenkova A.N., Belash D.E., YAKOVLEV A.F. (2013) Effektivnyj molekulyarno-geneticheskij metod identifikacii shtammov sal'monell i proteya // *Doklady Rossijskoj akademii sel'skohozyajstvennyh nauk*. – №5. – S. 60-63

2 ZHebrun A.B., Mukomolov S.A., Narvskaya O.V. (2009) Genotipirovanie i subtipirovanie patogennyh mikroorganizmov v razvitii tekhnologij epidemiologicheskogo nadzora // *Medicinskij akademicheskij zhurnal*. – №4. – S. 59-67.

3 Terletskiy, V., Tyshchenko, V., Martinez-Ballesteros, I., Garaizar, J., & Bikandi, J. (2009) Validation of double digest selective label database for sequenced prokaryotic genomes. *Bioinformatics*. – 26(3). – 417–418.

4 Terleckij V.P., Tyshchenko V.I., Novikova I.I., Bojkova I.V., Tyulebaev S.D., SHAHTAMIROV I.YA. (2016) Effektivnyj metod geneticheskoy pasportizacii shtammov Bacillus subtilis – perspektivnyh producentov biopreparatov // *Mikrobiologiya* – T. 85 №1.- S. 50-55.

5 Korenberg, E. I. (2010) Natural focality of infections: Current problems and prospects of research. *Biology Bulletin*. – 37(7). – 665–676.

6 Maunsell, F., & Donovan, G. A. (2008) Biosecurity and Risk Management for Dairy Replacements. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* – 24(1). 155–190.

7 Kostenko YU.G., Hramov M.V., Davleev A.D. (2012) Problema pishchevogo sal'monelleza v Rossii: ob'ektivnyj vzglyad i puti resheniya // *Vse o myase*. – №1. – S. 34-37

8 Parfenchik I.V., Cyrkunov V.M., Vasil'ev A.V., Bogdanovich T.I. (2010) Lechenie i sanaciya bol'nyh sal'monellezom, vyzvannym shtammami S. infantis i S. Mission // *Recept*. – №5. – S. 82-91

9 Mezencev S.V., Razumovskaya V.V. (2014) Rasprostranenie sal'monell v produkcii zhivotnovodstva // *Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. №7, S. 118-125

10 N. Starodub, J. (2012) Ogorodnijchuk Efficiency of immune biosensor based on total internal reflection ellipsometry at the determination of Salmonella // 14th International Meeting on Chemical Sensors – IMCS P. 884 – 887

11 Salautin V.V. (2004) Patomorfologiya i differencial'naya diagnostika sal'monelleza ptic, vyzvannogo razlichnymi serovariantami vzbuditeleya: avt. dis. ... dokt. vet. nauk. – Saratov, – 28 s.

12 CHugunova E.O., Tatarnikova N.A., Prohorova T.S., Maul' O.G. (2014) Zarazhennost' sal'monellami produkcii pticevodstva // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, №6 S. 18-23

13 Scharff R. L. (2012) Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *Journal of Food Protection* 75:123-131.

14 Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & Garcia-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556.

15 Alali W. Q., Gaydashov R., Petrova E., Panin A., Tugarinov O., Kulikovskii A., Mamleeva D., Walls I., Doyle M. P. (2012) Prevalence of Salmonella on retail chicken meat in Russian Federation. *Journal of Food Protection* 75:1469-73.

16 Lay K. S., Vuthy Y., Song P., Phol K., Sarthou J.L. (2011) Prevalence, numbers and antimicrobial susceptibilities of Salmonella serovars and Campylobacter spp. in retail poultry in Phnom Penh, Cambodia. *Journal of Veterinary Medical Science* 73:325-329.

17 Old D. C., Chisholm S. A., Crichton P. B., Taylor A. (2000) Grouping of Salmonella enterica serotype Montevideo strains by ribotyping and IS200 profiling. *Epidemiology and Infection* 124:375-382.

18 Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Moraes, P. M., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against Listeria monocytogenes, Salmonella Spp., and Staphylococcus aureus. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), 175–180.

19 E.O. CHugunova, N.A. Tatarnikova. (2013) Opredelenie bakterij roda Salmonella v myase i myasnyh polufabrikatah // *Permskij agrarnyj vestnik* №1 S. 41-44

20 Ruchnova O.I., Kurkina E.S. (2014) Biologicheskie svoystva izolyatov bakterij roda Salmonella // *Evrazijskij soyuz uchenykh* №30-1 S. 11-14

21 Kriger O.V., Soldatova L.S., Kravchenko A.YU., Novoselova M.V. (2012) Osnovnye aspekty konstruirovaniya prajmerov dlya opredeleniya vidovoj prinadlezhnosti DNK krupnogo rogatogo skota metodom polimeraznoj cepnoj reakcii // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. – № 2.

22 Horreo, J. L., Ardura, A., Pola, I. G., Martinez, J. L., & Garcia-Vazquez, E. (2012). Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 354–361.

- 23 Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979–986.
- 24 Strelkov A.A. (2011) Razrabotka uskorennoho immunologicheskogo metoda indikacii sal'monell v prodovol'stvennom syr'e i kormah. Avtoreferat kandidata biologicheskikh nauk po VAK RF 06.02.05, , Moskva.
- 25 YAcyshina S.B. (2003) Vyyavlenie i tipirovanie vozbuditelej sal'monelleza molekulyarno-geneticheskimi metodami. Avtoreferat kandidata biologicheskikh nauk po VAK RF 16.00.03, Moskva.
- 26 Otchet «Genotipirovanie patogennyh mikroorganizmov v pishchevom syr'e i produktah pitaniya, realizuemyh na rynkah i supermarketah Respubliki Kazahstan, razrabotka rekomendacij dlya snizheniya riska zaboлеваemosti detej doshkol'nogo i shkol'nogo vozrasta.
- 27 EFSA. (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. Parma, Italy: EFSA, 21February. Available at: http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/report_finlayinghens.html
- 28 Snow, L. C., Davies, R. H., Christiansen, K. H., Carrique-Mas, J. J., Cook, A. J. C., & Evans, S. J. (2010). Investigation of risk factors for *Salmonella* on commercial egg-laying farms in Great Britain, 2004-2005. *Veterinary Record*, 166(19), 579–586.
- 29 CARRIQUE-MAS, J. J., BRESLIN, M., SNOW, L., McLAREN, I., SAYERS, A. R., & DAVIES, R. H. (2008). Persistence and clearance of different *Salmonella* serovars in buildings housing laying hens. *Epidemiology and Infection*, 137(06), 837.
- 30 Gunn, J. S., Marshall, J. M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R. C., & Ryan, E. T. (2014) *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence // *Trends in Microbiology*, 22(11), 648–655.

**А.У. Исабек, С.О. Садикалиева, Е.Д. Бурашев,
О.В. Червякова, М.М. Касенов, К.Т. Султанкулова**

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
Казахстан, Жамбылская область, пгт. Гвардейский,
e-mail: isabekova__aisha@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕРВОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА

На данный момент значительную обеспокоенность вызывает распространение в мире эпизотий высокопатогенного вируса гриппа птиц. Вирус гриппа обладает наиболее высокой генетической вариабельностью и вероятностью появления новых штаммов, способных создавать большие эпидемии. Эволюция вируса гриппа протекает очень быстро, следовательно, первоочередной задачей исследователей является антигенное картирование подтипов гемагглютинина, а также выявления особенностей антигенной структуры. Рентгеновская кристаллография является часто используемым методом при определении трехмерной структуры белка.

Целью данных исследований являлось получение рекомбинантного белка первой субъединицы гемагглютинина методом бактериальной экспрессии в *Escherichia coli* для дальнейшего определения его трехмерной структуры.

В результате проведенных исследований плазида, имеющая в своем составе нуклеотидную последовательность гена, кодирующего целевой белок первой субъединицы гемагглютинина, была трансформирована в клетки *E. coli*, штамм ER2566. Были отработаны оптимальные условия экспрессии целевого гена в клетках *E. coli*, штамм ER2566 и очистки рекомбинантного белка методом металл-аффинной хроматографии. Степень очистки белка составила не менее 95%. Полученный рекомбинантный белок будет использован для дальнейших работ по кристаллографии и трехмерному моделированию белка.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, гемагглютинин, экспрессия, рекомбинантный белок.

A.U. Isabek, S.O. Sadikalieva, E.D. Burashev,
O.V. Chervyakova, M.M. Kasenov, K.T. Sultankulova

The Research Institute for Biological Safety Problems,
Kazakhstan, Gvardeyskiy, Zhambyl dist., e-mail: isabekova__aisha@mail.ru

Obtaining protein preparations of the first subunit of hemagglutinin influenza virus

At the moment, there is considerable concern about the spread in the world of epizootics of the highly pathogenic avian influenza virus. Influenza virus has the highest genetic variability and the likelihood of new strains that can create large epidemics. The evolution of the influenza virus proceeds very quickly, therefore, the paramount task of the researchers is antigenic mapping of hemagglutinin subtypes, as well as identifying the characteristics of the antigenic structure. X-ray crystallography is a commonly used method for determining the three-dimensional structure of a protein.

The purpose of these studies was to obtain a recombinant protein of the first hemagglutinin subunit by bacterial expression in *Escherichia coli* to further determine its three-dimensional structure.

As a result of the research, a plasmid containing the nucleotide sequence of a gene encoding the target protein of the first hemagglutinin subunit was transformed into *E. coli* cells, strain ER2566. The optimal conditions for the expression of the target gene in *E. coli* cells, strain ER2566, and purification of the recombinant protein by metal affinity chromatography were worked out. The degree of protein purification was at least 95%. The resulting recombinant protein will be used for further work on crystallography and three-dimensional modeling of the protein.

Key words: avian influenza virus, hemagglutinin, expression, recombinant protein.

А.У. Исабек, С.О. Садикалиева, Е.Д. Бурашев,
О.В. Червякова, М.М. Касенов, К.Т. Султанкулова

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты,
Қазақстан, Жамбыл облысы, Гвардейский қтқ., e-mail: isabekova___aisha@mail.ru

Тұмау вирусының гемагглютининінің бірінші бөлігінің ақуыздық препаратын алу

Қазіргі уақытта құс тұмауының жоғары патогенді вирусының эпизоотиясының бүкіл әлемде таралуы өте үлкен алаңдаушылық тудырады. Тұмау вирусы аса жоғары генетикалық өзгергіштікке ие. Жаңа штаммдардың пайда болуы үлкен эпидемия тудыру мүмкіншілігі өте жоғары болып табылады. Тұмау вирусының эволюциясы өте тез жүреді, сол себептен қазіргі таңда зерттеушілердің басты міндеті тұмау вирусының гемагглютининінің түрлерін антигендік карталандыру, сонымен қатар антигендік құрылымының сипаттамаларын анықтау болып табылады. Рентгендік кристаллография әдісі ақуыздың құрылымын анықтауда жиі қолданылатын әдіс болып саналады.

Жұмыстың мақсаты – *Escherichia coli* жасушалары негізінде бактериалды экспрессия әдісін қолдана отырып, тұмау вирусының гемагглютининінің бірінші бөлігінің рекомбинантты ақуызын алу және одан әрі оның үш өлшемді құрылымын анықтау болып табылады.

Зерттеулер нәтижесінде гендік нуклеотидтер тізбегі бар тұмау вирусының гемагглютининінің бірінші бөлігінің ақуызын кодтайтын плазмида *Escherichia coli* жасушаларының ER2566 штампына енгізілді. Металл-афиндік хроматография арқылы рекомбинантты ақуызды тазартуға оңтайлы жағдайлар жасалды. Ақуызды тазарту деңгейі кем дегенде 95% құрады. Алынған рекомбинантты ақуыз әрі қарай кристаллография және ақуызды үш өлшемді модельдеу үшін қолданылады.

Түйін сөздер: құс тұмауы вирусы, гемагглютинин, экспрессия, рекомбинантты ақуыз.

Введение

Вирус птичьего гриппа является чрезвычайно заразной, многоорганной системной болезнью домашней птицы, приводящей к высокой смертности. Вирус птичьего гриппа является одним из смертельно опасных патогенов [1, 2]. Данным вирусом заражаются многие виды диких и домашних птиц, большое количество различных видов млекопитающих и человек. Вирусы гриппа типа А принадлежат к роду *Alphainfluenzavirus* семейства *Orthomyxoviridae* и вызывают сезонные заболевания с высокой заболеваемостью и смертностью у 5-10% населения мира. С конца 2003 года H5N1 достиг эпизоотического уровня у домашней птицы в ряде азиатских стран, включая Китай, Вьетнам, Таиланд, Корею, Индонезию, Японию и Камбоджу, и теперь распространился на популяции диких птиц [3, 4].

Вирусы гриппа типа А и В имеют 8 генов, которые кодируют 10 белков, включая поверхностные белки гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). В случае вируса гриппа типа А поверхностные белки были разделены на различные подтипы в соответствии с различиями. На сегодняшний день были определены 16 подтипов HA и 9 подтипов NA [5, 6]. Гемагглютинин и нейраминидаза формируют поверхностные пепломеры вириона и являются основными мишенями для противовирусных антител [7, 8].

HA играет ключевую роль в инициации вирусной инфекции, связываясь с концевыми сиаловыми кислотами (N-ацетилнейраминовой кислотой [NeuAc]) гликановых рецепторов на клетках-хозяевах с последующим рН-зависимым слиянием вирусной оболочки с мембраной клетки-хозяина [9, 10]. Свойства гемагглютинина привлекают самое пристальное внимание исследователей. Гемагглютинин (HA), главный антиген на вирусной поверхности, является основной мишенью для нейтрализации антител и отвечает за связывание вируса с рецепторами хозяина, обеспечивая проникновение в клетку-хозяина посредством эндоцитоза и последующего слияния мембран. Гемагглютинин синтезируется в качестве одноцепочечного предшественника (HA0) в эндоплазматической сети, где он собирается в виде тримера, а затем экспортируется на поверхность клетки через аппарат Гольджи. На клеточной поверхности HA0 расщепляется специфическими протеазами-хозяевами на HA1 и HA2 [11-14].

Вирус гриппа постоянно меняется, и важно следить за молекулярной эволюцией циркулирующих штаммов, чтобы регулярно обновлять состав вакцины, разрабатывать новые препараты против гриппа [15, 16]. Знание пространственной структуры белка дает возможность определения механизма работы, направленной разработки профилактических препаратов. Определение

пространственной структуры белка (трехмерное моделирование) является бурно развивающейся отраслью современной науки [17, 18]. В настоящее время для получения 3D структур белковых молекул широко используются методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР), спектроскопии и рентгеновская кристаллография [19, 20].

Многие зарубежные известные учёные проводят исследования с использованием методов кристаллографии для получения трехмерной структуры белка и получают высокие результаты значимые как для терапии вируса гриппа, так и для определения механизмов патогенеза [21-23].

Рентгеновская кристаллография является наиболее популярным подходом для определения трехмерной структуры белка. Последующим этапом работы после очистки белков является кристаллизация препаратов. Следовательно, для получения кристаллов белков важным является получение высокоочищенного белкового препарата. Следовательно, получение белкового препарата является одним из основных этапов получения трехмерной структуры белка [24-27].

Целью данной работы является получение очищенного белка первой субъединицы вируса гриппа типа А для дальнейшего определения его трехмерной структуры.

Методы исследования

В качестве объекта исследования в работе был использован штамм А/курица/СКО/5/05 (H5N1) вируса гриппа птиц А/Н5, который был получен из коллекции микроорганизмов НИИПББ.

Экспрессия и определение растворимости рекомбинантного белка

Экспрессию рекомбинантного белка проводили в экспрессирующих клетках *E.coli* штамма ER2566. Из бактериальных штаммов, экспрессирующих рекомбинантный белок, готовили ночную культуру в LB среде с добавлением 50 мкг/мл канамицина (LB-kan50). Ночную культуру разводили средой LB-kan в соотношении 1:50, после чего клетки выращивали при 37 °С до OD₆₀₀=0.6-1 на шейкере (200 об/мин). Экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-тиогактопиранозидом (ИПТГ). После добавления ИПТГ ночную культуру инкубировали при 37 °С в течение 4 ч. Растворимость рекомбинантного белка определяли с использованием реагента B-PER® Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, США). Осадок клеток, которые были индуцированы,

ресуспендировали реагентом B-PER с добавлением 0,5 М ЭДТА и инкубировали в ротаторе в течение 30 минут. По истечению времени инкубации центрифугировали 20 минут при 13 000 об/мин. Отделили надосадок от осадка и провели ДСН-ПААГ-электрофорез для визуализации результатов.

ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуоблот

Электрофоретическое разделение белков проводили в 9 % ДСН-ПААГе. Для визуализации белков использовали окрашивание Coomassie G-250 или иммунодетекцию. Для иммунодетекции белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали с помощью поликлональных антител к рекомбинантным белкам. Нитроцеллюлозный блот блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре в буфере (ББ: 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, содержащем 5 % обезжиренного сухого молока). Затем блот инкубировали со вторичными антителами, меченными щелочной фосфатазой при тех же условиях. После чего проявляли добавлением субстрата BCIP/NBT.

Получение очищенных белковых препаратов

Для очистки рекомбинантного белка осадок клеток ресуспендировали в буфере (100 мМ Трис HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 1% DOX) из расчета 15 мл на 1 г сырого клеточного осадка. К полученной суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл. Лизис клеток осуществляли путём двукратного замораживания (-70 °С) – оттаивания (+37 °С) суспензии. Фракцию растворимых белков получали центрифугированием лизата клеток при 10000× g в течение 20 мин. Очистку белка проводили методом металло-аффинной хроматографии с использованием HisPur™ Cobalt Superflow Agarose (Thermo Scientific, США) в нативных условиях. Для солиubilизации белка использовали буфер NBV [50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 8М мочевины, pH 7,4]. Проводили трехкратную отмывку агарозы буфером NWB [20 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 15 мМ имидазол, pH 7,4]. Белки элюировали буфером NEB [20 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 500 мМ имидазол, pH 7,4]. Электрофоретическое разделение белков проводили в ДСН-ПААГ в денатурирующих редуцирующих условиях. Для визуализации белков использовали окрашивание Coomassie G-250.

Результаты исследований

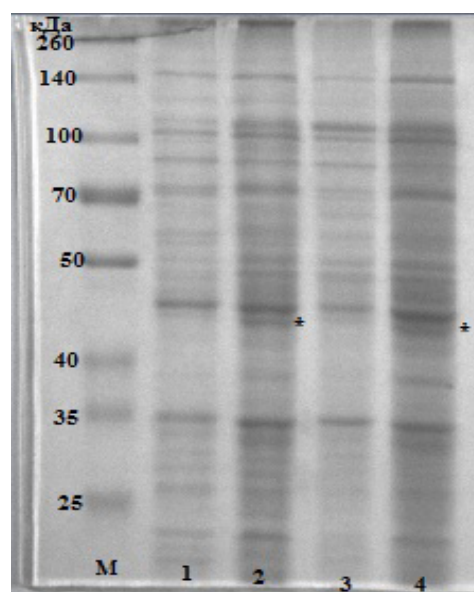
Авторами (Бурашев, 2019: 204) ранее были получены плазмидные ДНК, в которых в резуль-

тате ПЦР-анализа выявили наличие гена первой субъединицы гемагглютинина. Ранее полученные плазмидные ДНК были трансформированы в экспрессирующие клетки *E. coli* штамм ER2566 для проведения экспрессии первой субъединицы гемагглютинина [28].

Индукция экспрессии целевого гена ИПТГ приводила к наработке белкового продукта размером около 45 кДа, что соответствовало расчетной величине молекулярного веса рекомбинантного белка, также целью выбора условий очистки рекомбинантного белка HA1 определили его растворимость при экспрессии в клетках *E. coli*. (рис. 1).

Решение о том, следует ли очищать 6xHis-меченные белки в нативных или денатурирующих условиях зависит от местоположения и растворимости белка, доступности метки 6xHis, последующее применение и необходимость сохранения биологической активности. Поскольку взаимодействие между сорбентом и меткой 6xHis рекомбинантного белка не зависит от третичной структуры, белки могут быть очищены либо в нативной, либо в денатурирующей форме условия. Чтобы установить наилучшую стратегию очистки, важно определить, является ли белок растворимым в цитоплазме или находится в цитоплазматических тельцах включения. Многие белки образуют тельца включения, когда наблюдается высокий уровень экспрессии в бактериях, в то время как другие хорошо переносятся клеткой и остаются в цитоплазме в их родной конфигурации. Белки, которые содержат соответствующий лидерный пептид в последовательности могут секретироваться в периплазматическое пространство, но это зависит от клетки-хозяина и от природы как лидерного пептида, так и рекомбинантного белка.

Как видно из рисунка 1, в ночной культуре до добавления ИПТГ (индуктора экспрессии) синтез целевого белка не наблюдался (дорожка 1), а при добавлении ИПТГ наблюдается синтез предположительно целевого белка. Специфичность синтезируемого белка требуется определить иммунодетекцией. Также при определении растворимости синтезируемого белка (рис. 1) наблюдалось значительное накопление белка в клетке в растворимой форме (дорожка 4), в то время, когда в нерастворимой фракции белков накопление белка наблюдается в следовых количествах (дорожка 3). В результате определения растворимости установили, что очистку белка целесообразно проводить в нативных условиях.



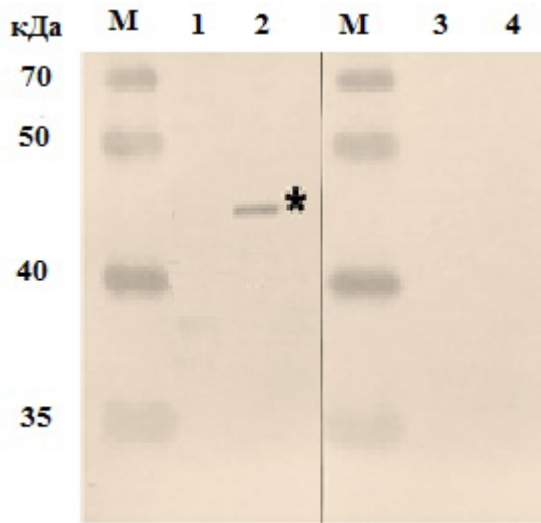
М – маркер молекулярного веса белков; 1 – лизат клеток до индукции экспрессии; 2 – лизат клеток после индукции экспрессии; 3- нерастворимая фракция белков (включения); 4 – растворимая фракция белков

Рисунок 1 – Результаты экспрессии и определения растворимости рекомбинантного белка (HA1) штамма вируса гриппа А/курица/СКО/5/05 (H5N1)

Для определения специфичности синтезируемого белка нами были проведены исследования иммунодетекции (рис 2). Данный метод является современным методом лабораторной диагностики и применяется в качестве более точного «подтверждающего» анализа.

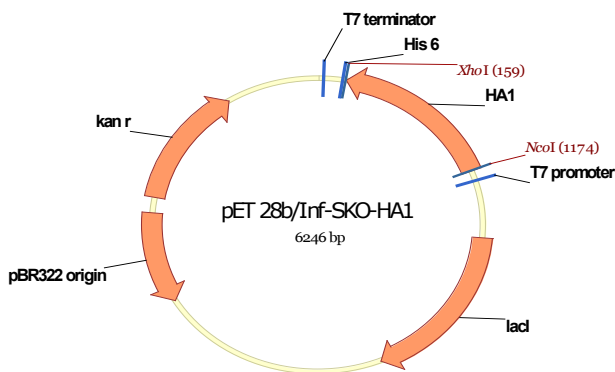
В результате проведения иммунодетекции было определено, что синтезируемый белок специфический связался с антителами в сыворотке H5N1 и визуально детектировался при добавлении субстрата (рис. 2 дорожка 2), в то время, когда при обработке данного белка нормальной сывороткой связывание и детекция не наблюдались (рис. 2 дорожка 4). Результаты иммуноблота определили, что синтезируемый рекомбинантный белок является первой субъединицей гемагглютинина.

При создании генетической конструкции для экспрессии целевого гена в состав нуклеотидной последовательности был включен участок, кодирующий гексагистидиновую метку His6 (рис. 3). Это позволило использовать для очистки целевого белка метод металл-аффинной хроматографии. Также согласно рисунку 3, в качестве сайтов рестрикции нами были выбраны сайты рестриктаз NcoI и XhoI, следовательно, клонирование гена первой субъединицы гемагглютинина проводили по выше указанным сайтам.



М – маркер молекулярного веса белков; 1,3- лизат клеток до индукции экспрессии; 2,4 – лизат клеток после индукции экспрессии. 1,2- пробы инкубированы специфической козьей сывороткой к рекомбинантному белку (H5N1); 3,4 – пробы инкубированы нормальной козьей сывороткой.

Рисунок 2 – Иммунодетекция синтезируемого рекомбинантного белка.

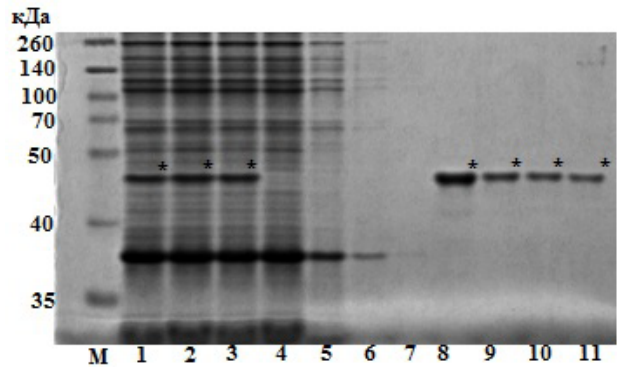


pBR322 origin- сайт начала репликации, kan r – ген устойчивости к канамицину, lacI-ген репрессора лактозного оперона, T7 promoter – промотор фага T7, T7 terminator – терминатор транскрипции фага T7, HA1 – встроенный рекомбинантный ген HA1, His6 – последовательность кодирующая гексагистидиновый таг

Рисунок 3 – Карта плазмиды pET28/Inf-SKO-HA1

Металл-аффинная хроматография является высокоспецифичным и надежным методом очистки рекомбинантных белков вследствие относительно высокого сродства и специфичности некоторых металлов к эпитопу, содержащему шесть или более остатков гистидина [29, 30].

Очистка белков, содержащих в своей структуре метки, достаточно проста, и можно сэкономить много времени благодаря высокой специфичности метки рекомбинантного белка и лиганда иммобилизованного на хроматографическом сорбенте. Конечно же, дальнейшая очистка рекомбинантного белка необходима, если требуется большая степень чистоты, но применение аффинной метки позволяет уже на первом этапе очистки избавиться от большинства примесных белков, облегчает и дальнейшую очистку.



М – маркер молекулярного веса белков; 1 – общий пул клеток; 2 – клеточный лизат до фильтрации; 3 – клеточный лизат после фильтрации; 4 – проскок через колонку; 5-7 – промывки; 8-11 – элюирование белка

Рисунок 4 – Электрофоретический анализ белковых фракций в процессе очистки целевого белка HA1 штамма А/курица/СКО/5/05 (H5N1)

На рисунке 3 показаны результаты электрофоретического анализа после очистки методом металл-аффинной хроматографии. В дорожке М – показан разбег маркера, белкового раствора с белками, у которых известна молекулярная масса. В первой дорожке показано распределение всех белков клетки-производителя по массе компонентов фракций. В четвертой дорожке показан результат связывания (адсорбция) гистидиновой метки белка и лиганда. Как видно из рисунка 3, белок полностью связался с лигандом. В дорожках 8-11 показаны результаты элюирования белка, согласно данным результатам видно, что использованный метод очистки позволил получить препараты рекомбинантного белка с чистотой не менее 95%.

Эндогенные белки с остатками гистидина, которые взаимодействуют с группами лиганда, могут быть удалены путем снижения рН промывочного буфера до 6,3 или путем до-

бавления имидазола в концентрации 10–50 мМ. В бактериальных системах экспрессии рекомбинантные белки обычно экспрессируются на высоких уровнях, а уровень загрязняющие белки относительно низкий. Поэтому, как правило, нет необходимости промывать связанный бхHis-меченный белок в очень жестких условиях. Нами не проводились процедуры промывки белков при пониженной концентрации буфера так как, в результате промывки буфером при рН 7,4 уровень загрязнения сопутствующими белками был почти нулевой.

Аналогично, если концентрация имидазола увеличивается до 100–250 мМ, бхHis-тегированный белки также будут диссоциировать, потому что они больше не могут конкурировать за сайты связывания на смоле. Условия элюирования являются высоко воспроизводимыми, но должны быть определены для каждого бхHis-тегированного белка. Мономеры обычно элюируются при рН примерно 5,9, тогда как агрегаты и белки, которые содержат более одной метки бхHis, элюируются при рН приблизительно 4,5. Реагенты, такие как EDTA или EGTA, хелатируют ионы кобальта

и удаляют их из НТА группы. Это приводит к тому, что бхHis-меченный белок элюируется в виде белково-металлического комплекса. При элюировании белков нами был использован буфер с содержанием 500 мМ имидазола и рН 7,4.

Выводы

В результате проведенных исследований была создана генетическая конструкция для экспрессии белка HA1 в клетках *E.coli*. Отработаны оптимальные условия экспрессии и очистки целевого рекомбинантного белка. Определена специфичность синтезируемого белка иммунодефекцией. Степень очистки белка составила не менее 95%.

Полученный рекомбинантный белок будет использован для дальнейших работ по кристаллографии и трехмерному моделированию белка.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках проекта AP05132243, финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

Литература

- 1 Swayne D.E., Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza // Rev. Sci. Tech. – 2000. – Vol. 8. – P. 463–482.
- 2 Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes // Virology. – 1996. – Vol. 217. – P. 508–516
- 3 Всемирная организация здравоохранения. Руководство по лабораторной диагностике и вирусологическому надзору за гриппом. Всемирная организация здравоохранения, Женева, Швейцария. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1
- 4 Lyons D., Lauring A. Mutation and Epistasis in Influenza Virus Evolution // Viruses. – 2018. – Vol. 10. – P. 401–407
- 5 Visher E., Whitefield S.E., McCrone J.T., Fitzsimmons W., Lauring A.S. The Mutational Robustness of Influenza A Virus // PLoS Pathog. – 2016. – Vol. 12. – P. 56–58.
- 6 Swayne D.E., Suarez D.L. Highly pathogenic avian influenza // Rev. Sci. Tech. – 2000. Vol. 19. – P. 463–482.
- 7 Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia / D.K. Lvov, N.V Kaverin // In: Klenk H.D., Matrosovich M., Steh J., eds. Monographs in Virology. Volume 27: Avian Influenza. Basel, Switzerland: Karger, 2008: 41–58.
- 8 Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin // Voprosy virusologii. – 2012. – Vol. 1. – P. 148–158.
- 9 Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin // Annu Rev Biochem. – 2000. – Vol. 69. – P. 531–569.
- 10 Air G.M. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus // Proc Natl Acad Sci. – 1998. – Vol. 78. – P. 7639–7643.
- 11 Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus // Science. – 2006. – Vol. 312. – P. 404–410.
- 12 Khurana S., Verma S., Verma N., Crevar C.J., Carter D.M., Manischewitz J., King L.R., Ross T.M., Golding H. Bacterial HA1 vaccine against pandemic H5N1 influenza virus: evidence of oligomerization, hemagglutination, and crossprotective immunity in ferrets // J. Virol. – 2011. Vol. 85. – P. 1246–1256.
- 13 Harper S et al. Influenza // Clinics in Laboratory Medicine. – 2002. – Vol. 22, No. 4. – P. 863–882.
- 14 Kido H., Yokogoshi Y., Sakai K., Tashiro M., Kishino Y., Fukutomi A Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein // J. Biol. Chem. – 1992. – P. 13573–13267.
- 15 Skehel J. J., Wiley D. C., Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin // Annu. Rev. Biochem. – 2000. Vol. 69. – P. 520–531.

- 16 Nelson M.I., Holmes E.C. The evolution of epidemic influenza // *Nat Rev Genet.* – 2007. Vol. 8. – P. 196–205.
- 17 Nobusawa E., Sato K. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses // *J Virol.* – 2006. Vol. 80. – P. 3675–3678.
- 18 Хёльте Х.Д., Зипплъ В., Роньян Д., Фолькерс Г. Молекулярное моделирование. Теория и практика. – М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015.
- 19 Levinthal C., Molecular Model-Building by Computer // *Scientific American.* – 1966. Vol. 214. – P. 42–52.
- 20 Levitt M., The birth of computational structural biology // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. Vol. 8. – P. 392–393.
- 21 Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol // *Antiviral Res.* – 2008. – Vol. 81, No 2. – P. 132-140.
- 22 Kadama R.U., Wilson I.A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. Department of Integrative Structural and Computational Biology. The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, 2016 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2017. Vol. 114. – P. 4848-4850.
- 23 Faix J., Grosse R. Staying in shape with formins // *Dev. Cell.* – 2006. Vol.10. – P. 693–706.
- 24 Bolanos-Garcia V. M., Chayen N. E. New directions in conventional methods of protein crystallization // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2009. Vol. 101. – P. 1203–1210.
- 25 Chayen N. E., Saridakis E. Sear R. P. Experiment and theory for heterogeneous nucleation of protein crystals in a porous medium // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. Vol. 103. – P. 597–601.
- 26 Boyko K.M., Popov V.O., Kovalchuk M.V. Promising approaches to crystallization of macromolecules suppressing the convective mass transport to the growing crystal // *Russ. Chem. Rev.* – 2015. – Vol. 84 (8). – P. 853-859.
- 27 Russo Krauss I. et al. An overview of biological macromolecule crystallization // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, № 6. – P. 11643–11691.
- 28 Е.Д. Бурашев, А.У. Исабек, К.Т. Султанкулова, Н.Т. Сандыбаев Создание векторной конструкции и бактериальная экспрессия первой субъединицы гемагглютинина // *Вестник СемГУ.* – 2019. №3(87). С. 204-208
- 29 Hochuli E. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Dobeli, R. Gentz, D. Stuber // *Biotechnology.* – 1988. V. 6. – P. 1321–1325.
- 30 Wei C. Nurul T, Wahida AG, Shaharum S. Construction and heterologous expression of a truncated haemagglutinin (HA) protein from the avian influenza virus H5N1 in *Escherichia coli* // *Trop. Biomed.* – 2014. Vol. 31. – P. 1-10.

References

- 1 Swayne D.E., Suarez D.L. (2000) Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 19:463–482.
- 2 Rohm C, Zhou N, Suss J, Mackenzie J, Webster RG. (1996). Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217:508–516.
- 3 World Health Organization. Guidelines for laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1
- 4 Lyons D., Luring A. (2018) Mutation and Epistasis in Influenza Virus Evolution. *Viruses*, 10: 401-407.
- 5 Visher E, Whitefield S.E., McCrone J.T., Fitzsimmons W., Luring A.S. (2016) The Mutational Robustness of Influenza A Virus. *PLoS Pathog*, 12(8)
- 6 Swayne D.E., Suarez D.L. (2000) Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech.*, 19:463–482.
- 7 Lvov D.K., Kaverin N.V. (2008) Avian influenza in Northern Eurasia. *Monographs in Virology*. Vol. 27: Avian Influenza. Basel, Switzerland: Karger; 41–58.
- 8 Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. (2012) Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin. *Voprosy virusologii. Suppl.* 1:148–58.
- 9 Skehel J.J., Wiley D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531–569.
- 10 Air GM. (1981). Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci*, 78:7639–7643.
- 11 Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taubenberger, J.K., Paulson, J.C., Wilson I.A. (2006) Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 312:404–410
- 12 Khurana S, Verma S, Verma N, Crevar CJ, Carter D.M, Manischewitz J, King L.R, Ross T.M, Golding H. (2011) Bacterial HA1 vaccine against pandemic H5N1 influenza virus: evidence of oligomerization, hemagglutination, and crossprotective immunity in ferrets. *J. Virol.*, 85:1246–1256.
- 13 Harper S et al. (2002). Influenza. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22(4):863–882.
- 14 H Kido, Y Yokogoshi, K Sakai, M Tashiro, Y Kishino, A Fukutomi and N Katunuma (1992) Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 267:13573-13267.
- 15 J. J. Skehel, D. C. Wiley, (2000) Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin *Annu. Rev. Biochem.*, 69:520-531
- 16 Nelson M.I, Holmes E.C. (2007) The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.*, 8:196–205.
- 17 Nobusawa E, Sato K. (2006) Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol.*, 80:3675–3678.
- 18 Hjol'te H.-D., Zippel' V., Ron'jan D., Fol'kers G. (2005) Molekuljarnoe modelirovanie [Molecular modeling]. *Teorija i praktika. Laboratorija znaniy* [in Russian]

- 19 Levinthal C., (1966) Molecular Model-Building by Computer. *Scientific American.*, 214:42–52
- 20 Levitt M., (2001) The birth of computational structural biology, *Nat. Struct. Biol.*, 8:392–393
- 21 Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. (2008) Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.*, 81(2):132-140.
- 22 R.U. Kadama, I.A. Wilson. (2017) Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114 (19):4848-4850
- 23 Faix J., (2006) Grosse R. Staying in shape with formins. *Dev. Cell.*,10:693–706
- 24 Bolanos-Garcia V. M., Chayen N. E. (2009) New directions in conventional methods of protein crystallization. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 101:1203–1210.
- 25 Chayen N. E., Saridakis E., Sear R. P. (2006) Experiment and theory for heterogeneous nucleation of protein crystals in a porous medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:597–601
- 26 Boyko K.M., Popov V.O., Kovalchuk M.V. (2015) Promising approaches to crystallization of macromolecules suppressing the convective mass transport to the growing crystal. *Russ. Chem. Rev.*, 84 (8):853-859.
- 27 Russo Krauss I. et al. (2013) An overview of biological macromolecule crystallization. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(6):11643–11691.
- 28 E.D. Burashev, A.U. Isabek, K.T. Sultankulova, N.T. (2019) Sandybaev Sozdanie vektornoj konstrukcii i bakterial'naja jekspressija pervoj subedinicy gemaggljutinina [Creation of a vector construct and bacterial expression of the first subunit of hemagglutinin] *Vestnik SemGU*, 3(87):204-208. [in Russian]
- 29 Hochuli E. Bannwarth E., Hochuli W., Dobeli H., Gentz R., Stuber D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent *Biotechnology*, 6:321–1325.
- 30 Wei C, Nurul T, Wahida AG, Shaharum S. (2014) Construction and heterologous expression of a truncated haemagglutinin (HA) protein from the avian influenza virus H5N1 in *Escherichia coli*. *Trop. Biomed.* 31:1–10.

5-бөлім
**АДАМ ЖӘНЕ ЖАНУАРЛАР
ФИЗИОЛОГИЯСЫ**

Section 5
**HUMAN AND ANIMAL
PHYSIOLOGY**

Раздел 5
**ФИЗИОЛОГИЯ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

О.А. Деева¹ , С.С. Ледяева¹ , Д.С. Кадырбаева², Г.Т. Срайлова¹ 

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Центр молекулярной медицины, Казахстан, г. Алматы, e-mail: avesna3103@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДНОЙ СИСТЕМЫ У ДЕВОЧЕК-ПОДРОСТКОВ С НАРУШЕНИЯМИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

Пубертатный период является одним из самых сложных периодов становления организма. Именно этот период характеризуется морфологическими и функциональными перестройками. Под действием половых гормонов, секретируемых организмом в больших количествах, происходит перестройка нейроэндокринной системы. В Казахстане ежегодно снижается показатель рождаемости населения, так как проблемы с зачатием имеет каждая шестая семья. Данная проблема связана в первую очередь с проблемами репродуктивного здоровья, которые начинаются уже в школьном возрасте. Тяжелые учебные нагрузки, информационное перенапряжение, эмоциональный стресс, нарушение режима сна и бодрствования, неблагоприятные воздействия окружающей среды способствуют негативному сдвигу физиологических показателей от нормы. Длительное пребывание в таких условиях ведет к отклонению физиологических функций от нормы, и, как следствие, к нарушению функций репродуктивных органов. Целью данной работы явилось исследование гипофизарных (ЛГ, ФСГ), половых (тестостерон, эстрадиол) гормонов в крови у 70 школьниц города Алматы в возрасте от 12 до 16 лет. Для выявления возможных причин гормональных нарушений в крови у школьниц был исследован тиреотропный (ТТГ) гормон. Исследования проводились на базе Центра молекулярной медицины. Результаты были получены методом ИФА. У большинства обследуемых школьниц были выявлены отклонения от нормы в сторону увеличения гормона и составляют ЛГ $12,1 \pm 0,53$ МЕ/л, ЛГ/ФСГ $2,52 \pm 0,17$, эстрадиол $395 \pm 0,28$ пг/мл, тестостерон $2,99 \pm 0,12$ нг/мл, ТТГ $3,7 \pm 0,02$ мкМЕ/л. Выявленные отклонения могут быть связаны с неблагоприятными экологическими условиями, так как Алматы находится в списке самых загрязненных городов среди стран СНГ. Поскольку большую часть рациона подростков составляют ГМО продукты, возможной причиной гормональных отклонений может быть неправильное питание.

Ключевые слова: репродуктивная система, лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликуло-стимулирующий гормон (ФСГ), эстрадиол, тестостерон, тиреотропный гормон (ТТГ), экология.

O.A. Deyeva¹, S.S. Ledyeva¹, D.S. Kadirbaeva², G.T. Srayilova¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

²Center of molecular medicine, Kazakhstan, Almaty, e-mail: avesna3103@gmail.com

Study of the hormonal status of the pituitary-gonadal system in adolescent girls with reproductive disorders

The puberty is one of the most difficult periods of the formation of the body. It is this period that is characterized by morphological and functional rearrangements. Under the influence of sex hormones secreted by the body in large quantities, the neuroendocrine system is rearranged. Heavy training loads, information overstrain, emotional stress, disturbance of sleep and wakefulness, adverse environmental influences contribute to a negative shift of physiological parameters from normal. A prolonged stay in such conditions leads to a deviation of physiological functions from the norm, and, as a result, to a violation of the functions of the reproductive organs. The aim of this work was to study pituitary (LH, FSH), sex (testosterone, estradiol) and thyroid-stimulating (TSH) hormones in the blood of schoolgirls in the city of Almaty. Research was conducted at the Centre of Molecular Medicine. A comprehensive analysis of hormones was performed in 70 girls of the city of Almaty aged 12 to 16 years. The results were obtained by ELISA. The mean norm values of FSH hormones were found to be 5.08 ± 0.19 IU / L, LH 5.14 ± 0.35 IU / L, LH / FSH 1.22 ± 0.03 , Estradiol $13.6 - 190.4$ pg / ml, testosterone 0.7 ± 0.07 ng / ml, TSH 2.06 ± 0.11 μ l / l. Most of the examined schoolgirls showed deviations from the norm in the direction of increasing hormone and on average are LH 12.1 ± 0.53 IU / L, LH / FSH 2.52 ± 0.17 ,

estradiol 395 ± 0.28 pg / ml, testosterone 2.99 ± 0.12 ng / ml, 3.7 ± 0.02 μ MU / L. Identified deviations may be associated with adverse environmental conditions, since Almaty is on the list of the most polluted cities among the CIS countries.

Key words: reproductive system, luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol, testosterone, thyroid-stimulating hormone (TSH), ecology.

О.А. Деева¹, С.С. Ледяева¹, Д.С. Кадырбаева², Г.Т. Сраилова¹

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Молекулалық медицина орталығы, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: avesna3103@gmail.com

Репродуктивті функциясының бұзылыстары бар жасөспірім қыздарда гипофизарлы-гонадалық жүйенің гормоналды күйін зерттеу

Пубертат кезеңі – ағзаның қалыптасуының ең күрделі кезеңдерінің бірі. Бұл кезең морфологиялық және функционалдық қайта бөлінумен сипатталады. Организм көп мөлшерде шығаратын жыныстық гормондардың әсерінен нейроэндокриндік жүйе қайта құрылады. Ауыр оқу жүктемелер, ақпараттық асқын кернеу, эмоциялық күйзеліс, ұйқы және сергектік режимнің бұзылуы, қоршаған ортаның қолайсыз әсері физиологиялық көрсеткіштердің қалыптыдан теріс өзгеруіне ықпал етеді. Мұндай жағдайларда ұзақ уақыт болу физиологиялық функциялардың нормадан ауытқуына және осының салдарынан репродуктивті органдар функцияларының бұзылуына әкеледі. Бұл жұмыстың мақсаты Алматы қаласындағы мектеп жасындағы қыздардың қанында гипофизарлы (ЛГ, ФСГ), жыныстық (тестостерон, эстрадиол) және тиреотропты (ТТГ) гормондарды зерттеу. Зерттеулер молекулалық медицина орталығында жүргізілді. 12 жастан 16 жасқа дейінгі Алматы қаласының 70 қызының гормондарына кешенді талдау жүргізілді. Нәтижелер ИФТ әдісімен алынды. ФСГ гормондарының орташа нормалық мәні $5,08 \pm 0,19$ МЕ/л, ЛГ $5,14 \pm 0,35$ МЕ/л, ЛГ/ФСГ $1,22 \pm 0,03$, эстрадиол $13,6 - 190,4$ пг/мл, тестостерон $0,7 \pm 0,07$ нг/мл, ТТГ $2,06 \pm 0,11$ мкМЕ/л. Зерттелетін оқушылардың көпшілігінде гормонның жоғарылауына қарай нормадан ауытқулар анықталды және орта есеппен ЛГ $12,1 \pm 0,53$ МЕ/л, ЛГ/ФСГ $2,52 \pm 0,17$, эстрадиол $395 \pm 0,28$ пг/мл, тестостерон $2,99 \pm 0,12$ нг/мл, $3,7 \pm 0,02$ мкМЕ/л. тең. Анықталған ауытқулар қолайсыз экологиялық жағдайларға байланысты болуы мүмкін, өйткені Алматы ТМД елдері арасында ең ластанған қалалар тізімінде.

Түйін сөздер: репродуктивті жүйесі, лютеиндеуші гормон (ЛГ), фолликулстимулдеуші гормон (ФСГ), эстрадиол, тестостерон, ТТГ.

Введение

Подростковый, или пубертатный, период – это период интенсивного роста и развития организма. В этот период происходят изменения, следствием которых является наступление половой и физической зрелости. Данные процессы находятся под контролем различных эндокринных и нейроэндокринных факторов. Пубертатный возраст является одним из самых сложных периодов развития организма. Именно в этот период происходит физиологическое и психо-эмоциональное становление организма, сопровождающееся морфологическими и функциональными перестройками. Под действием половых гормонов, которые организм в подростковом периоде выделяет усиленно, происходит перестройка нейроэндокринной системы. Также, изменяется работа вегетативной нервной системы, контролирующей рост и развитие организма, работу внутренних органов [1].

Перестройка механизмов регуляции идет параллельно с периодом социального становления

ребенка, изменением образа жизни, изменением положения в обществе [2, 3].

Иными словами, в этот период происходит усиленный рост организма, повышается двигательная активность и нервно-психическая активность подростка. Все это приводит к перенапряжению вегетативной нервной системы и эндокринной системы за счет усиления работы эндокринных желез и обменных процессов внутри организма. У девочек-подростков наблюдается снижение выносливости, снижается адаптация к физическим нагрузкам. Результатом этих процессов, в совокупности с влиянием неблагоприятных факторов внешней среды, являются вегетативные дистонии и другие психические и поведенческие изменения.

Таким образом, репродуктивное здоровье школьников является важным звеном развития личности. Дети являются демографическим капиталом нашей республики, демографическим ресурсом, ведь именно от здоровья подрастающего поколения зависит здоровье всей нации. Именно поэтому репродуктивному здоровью де-

тей школьного возраста уделяется большое внимание.

Тяжелые учебные нагрузки, информационное перенапряжение, эмоциональный стресс, нарушение режима сна и бодрствования, снижение количества времени пребывания на свежем воздухе, снижение физической активности способствуют негативному сдвигу физиологических показателей от нормы. Длительное пребывание в таких условиях ведет к отклонению физиологических функций от нормы, и, как следствие, к нарушению функций репродуктивных органов [4, 5].

Большое количество девочек, около 75%, к 18-летнему возрасту, т.е. к окончанию школы, имеют хронические заболевания, касающиеся внутренних органов. Генитальные патологии и гинекологические заболевания составляют 23,6%, среди которых, почти половина составляют нарушения менструального цикла и ювенильные маточные кровотечения. Высокий процент составляют девочки в возрасте от 15 до 17 лет, страдающие аменореей – около 20%. Все это составляет огромный риск развития бесплодия среди молодого поколения [6].

Таким образом, подростковый период является важным периодом практически во всех аспектах, включающих физиологическое, эндокринное, психологическое развитие организма.

Важность пубертатного периода объясняется и тем, что именно от нормального физиологического протекания всех процессов этого периода зависит благополучность полового развития подростка, а именно репродуктивные функции, фертильность, детородные способности, которые являются одним из важных показателей статуса здоровья взрослого населения [7].

В настоящее время, репродуктивному здоровью подростков уделяется большое внимание. Репродуктивное здоровье детей и подростков имеет значение не только в медицинском аспекте, но и в социальном, так как снижение количества воспроизведения населения ведет к снижению рождаемости в нашей стране.

В Казахстане ежегодно снижается показатель рождаемости населения. Данная проблема связана в первую очередь с проблемами репродуктивного здоровья, которые начинаются уже в школьном возрасте. Так, за последние 10 лет, индекс рождаемости достигал своего пикового значения только в 2014 году и составлял 23,10 родившихся на 1000 человек. За последние несколько лет уровень рождаемости сократился до 390 262 человек в 2017 году, т.е. 21,64 новорожденных на 1000 человек (рис 1) [8].



Рисунок 1 – Показатели рождаемости в Казахстане

В 2018 году Центральное разведывательное управление США (ЦРУ США) так же предоставило на своем официальном сайте статистические данные 226-ти стран по уровню рождаемости. Среди представленных стран есть и Казахстан, который занимает 99-е место. В 2018 году показатель рождаемости на 1000 человек составил 17,5, что на 4,14 меньше, чем статистические данные 2017 года. Данные подтверждают ежегодное снижение уровня рождаемости населения страны, причинами которого является гормональный дисбаланс, способствующий нарушению репродуктивной системы половозрелого населения [9,10].

Наряду с сокращением рождаемости, происходит и ежегодное снижение естественного прироста населения (рис 2). Согласно КС МНЭ РК, пиковое значение приходится так же на 2014 год и составляет 15,45. К началу 2018 года этот показатель снизился до 14,5.

Известно, что среди всего населения Казахстана, лишь в 54,3% официально зарегистрированных семей есть дети, а это означает, что в настоящее время возрастает тенденция бездетных браков [8]. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) были предоставлены данные, согласно которым в Казахстане проблемы с зачатием имеет каждая шестая семья. Этот вопрос так же был поднят в 2017 году на IX Международном конгрессе Казахстанской ассоциации репродуктивной медицины (КАРМ), тема которого была «Современные подходы к лечению бесплодия. ВРТ: Настоящее и будущее». На данном конгрессе был озвучен процент официально зарегистрированных семей, имеющих проблемы с зачатием ребенка – 15% или же 350 000 супружеских пар.

В настоящий период идет тенденция к стремительному снижению рождаемости и преобладанию естественной смертности над уровнем рождаемости. Ежегодно снижающийся уровень рождаемости населения Казахстана связан в первую очередь с проблемами репродуктивного здоровья [10].



Рисунок 2 – Естественный прирост населения Казахстана

Проблемы репродуктивного здоровья девочек города Алматы могут быть связаны с неблагоприятными экологическими условиями [11]. Алматы находится в списке самых загрязненных городов среди стран СНГ. По данным Всемирной организации здравоохранения, концентрация вредных веществ в воздухе превышает допустимую норму в 4 раза [12]. За 2016 год количество вредных выбросов в воздух составило 285 тонн. Из них, 80% приходится на автомобильный транспорт, 11% составляют загрязнения воздуха от ТЭЦ-2, остальные 9% приходятся на другие источники [13].

Пубертатный период особенно уязвим к влиянию неблагоприятных факторов окружающей среды, так как наибольшее влияние на репродуктивные структуры вредные вещества оказывают именно в перiovуляторную фазу, т.е. тогда, когда завершается формирование гамет. Такое влияние вредных веществ приводит к нарушению созревания ооцитов и овуляции, следствием является нерегулярный менструальный цикл и аменорея. Находясь в критическом периоде развития, организм школьников является одной из главных мишеней действия данных веществ [14, 15].

Особенно опасны гормоноподобные ксенобиотики (ксеноэстрагены, ксеноандрогены, фталаты, фенолы, различные пестициды, по-

лициклические ароматические углеводороды, парабыны и др.) находящиеся в составе загрязненного воздуха [16]. Данные вещества имеют схожее со стероидными гормонами строение. Гормональная активность данных веществ ниже, по сравнению с гормональной активностью половых стероидов. Однако, при длительном действии на организм, гормоноподобные ксенобиотики накапливаются в жировой ткани и связываются с рецепторами половых гормонов, подавая сигнал о наличии большого количества гормонов репродуктивной системы в организме [17, 18]. Данные сигналы являются «ложными» и, ведут к изменению обратных связей между гипофизом, гипоталамусом и половыми железами. Следствием изменения обратных связей являются нарушения эндокринной и, соответственно, репродуктивной систем [19, 20, 21].

Еще одной причиной нарушений репродуктивного здоровья подростков является неправильное питание, а именно, продукты с содержанием ГМО. Широко применяется ГМО при выращивании картофеля, кукурузы, сои, сахарной свеклы, томата и риса. Составным компонентом колбасных изделий, которые подростки ежедневно употребляют в пищу, является ГМО-соя [22, 23]. ГМО продукты получены путем вставки чужого гена ДНК с целью улучшения сортов растений. Обычно таким геном выступают вирусы и кольцевые ДНК – транспозоны и плазмиды. ГМО продукты способны влиять на потомство и репродуктивные функции организма [24, 25, 26]. Многочисленные экспериментальные данные связывают влияние ГМО на репродуктивную систему с неустойчивостью генетической конструкции генномодифицированных продуктов и проникновением данных генов (транспозоны, плазмиды) в половые клетки. В экспериментах на крысах было показано негативное влияние ГМО на репродуктивные функции, а именно, отсутствие потомства у особей, питающихся ГМО продуктами [27, 28, 28, 30].

Материалы и методы исследования

Исследования данной работы были проведены на базе Центра молекулярной медицины. Был проведен анализ гормонов сыворотки крови у 70 девочек города Алматы в возрасте от 12 до 16 лет. Был исследован уровень гипофизарных (ЛГ, ФСГ), половых (тестостерон, эстрадиол) и тиреотропного (ТТГ) гормонов. Анализы крови были взяты в фолликулиновую фазу менструального цикла. Результаты определялись методом

иммуноферментного анализа на японском приборе-анализаторе Tosoh AIA-360.

Результаты исследования и их обсуждение

Менструальный цикл состоит из нескольких фаз, каждая из которых характеризуется усиленной секрецией того или иного гормона. Институтом гинекологии и акушерства были разработаны нормы показателя содержания ЛГ и ФСГ в фолликулиновую фазу для возрастной категории 12 – 16 лет. Данный показатель составляет 1,1 – 8,7 МЕ/л и 1,8 – 11,3 МЕ/л соответственно.

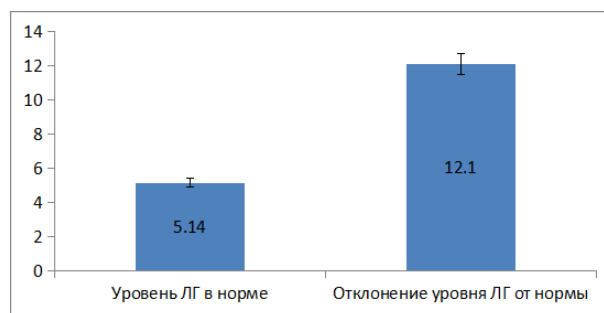
ФСГ регулирует процесс созревания фолликулов яичника, в следствии чего, формируется зрелый фолликул – граафов пузырек. Именно зрелый фолликул секретирует эстрадиол, являющийся основным гормоном, регулирующим менструальный цикл девочек-подростков. Под действием эстрадиола происходит рост и развитие яйцеклетки, дозревание фолликула, подготовка организма к овуляции. Таким образом, ФСГ, воздействуя на яичник, усиливает процессы созревания фолликулов, которые, в свою очередь, активизируют выработку эстрадиола. Наибольшее содержание эстрадиола в крови приходится на овуляционный пик, после овуляции концентрация этого гормона в крови снижается [31, 32].

Исследования, проводимые нами, не выявили каких-либо отклонений концентрации ФСГ в сыворотке крови у девочек – подростков. Средний показатель данного гормона в крови у школьниц составил $5,08 \pm 0,19$ МЕ/л.

Однако, для правильной работы яичника и секреции им эстрадиола, одного фолликулостимулирующего гормона недостаточно. Выработка эстрадиола будет происходить лишь при совместном влиянии гонадотропных гормонов ФСГ и ЛГ [33].

Таким образом, гонадотропные гормоны ЛГ и ФСГ регулируют секрецию яичниками половых гормонов. Такая регуляция происходит благодаря механизму обратной связи, которая состоит в следующем: повышение концентрации ЛГ и ФСГ активизирует секрецию яичниками половых гормонов, и наоборот [34, 35].

Содержание ЛГ в сыворотке крови у половины (50%) обследованных девочек составил $5,14 \pm 0,35$ МЕ/л, что соответствует показателям нормы, разработанным Институтом гинекологии и акушерства для данной возрастной группы. У другой половины обследованных девочек уровень ЛГ в сыворотке крови был в 2,4 раза повышенным и составил $12,1 \pm 0,53$ МЕ/л. (рис. 3,4).



* – $p \leq 0.05$

Рисунок 3 – Содержание ЛГ в сыворотке крови обследованных девочек



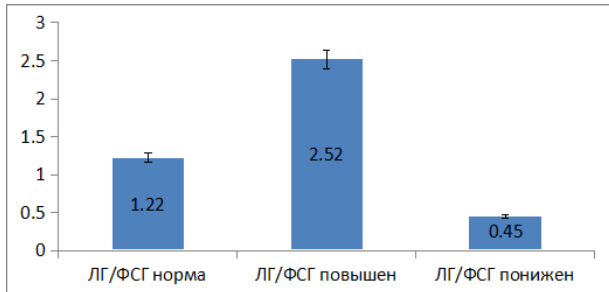
Рисунок 4 – Соотношение нормы и отклонений уровня ЛГ в крови у обследованных девочек

Высокое содержание ЛГ свидетельствует о наличии нарушений механизма обратной связи, т.е. нарушается связь между гипоталамусом, секретирующим гонадотропные гормоны, и половыми железами – яичниками [36]. Повышение ЛГ в фолликулиновую фазу может быть следствием гипофункции яичников, аменореи, синдрома поликистозных яичников (СПКЯ) [37]. Еще одной причиной повышения концентрации ЛГ в сыворотке крови является высокое содержание гормона тестостерона, являющегося следствием наличия СПКЯ [38].

Несмотря на то, что показатели ЛГ и ФСГ могут быть в норме, отношение ЛГ/ФСГ может быть нарушено. ЛГ/ФСГ является одним из главных показателей фертильности девочек. В норме, установленной Центром акушерства и гинекологии, показатель ЛГ/ФСГ варьирует от 1 до 1,5.

Согласно нашим исследованиям, отклонения данного показателя от нормы выявлены у 55,5% девочек. У 44,5% школьниц увеличенное соотношение ЛГ/ФСГ и 11% имеют отклонения в сторону понижения. У 44,5% школьниц откло-

нений не выявлено, средний показатель равен $1,22 \pm 0,03$, что соответствует норме, установленной Центром акушерства и гинекологии. Средние показатели увеличенного соотношения ЛГ/ФСГ составляет $2,52 \pm 0,17$, пониженного – $0,45$ (рис. 5,6).



* – $p \leq 0.05$

Рисунок 5 – Соотношение гормонов ЛГ/ФСГ в сыворотке крови обследованных девочек

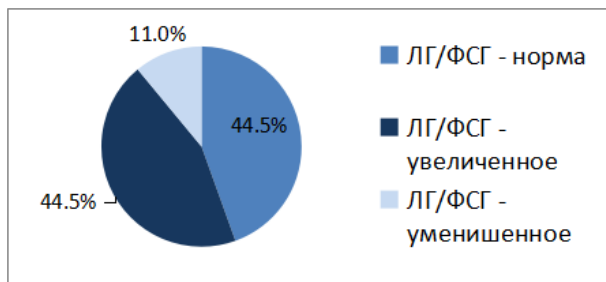


Рисунок 6 – Процент обследованных девочек с разным соотношением гормонов ЛГ/ФСГ в сыворотке крови

Соотношение ЛГ/ФСГ выше нормы было зафиксировано у 44,5% обследованных школьниц. Причинами данного отклонения могут быть синдром поликистозных яичников (СПКЯ) и недостаточность яичников. Данные заболевания являются следствием нарушения работы как самих яичников, так и гипоталамо-гипофизарной системы, являющейся главным звеном нормальной работы репродуктивных органов. В результате нарушается выработка релизинг-факторов гипоталамусом, выработка гонадотропных гормонов гипофизом, секреция яичниками половых гормонов (эстрадиол и прогестерон).

Таким образом, нарушения соотношения ЛГ/ФСГ приводят к изменению секреции эстрадиола. Следствием данного нарушения является аменорея и развитие бесплодия [39].

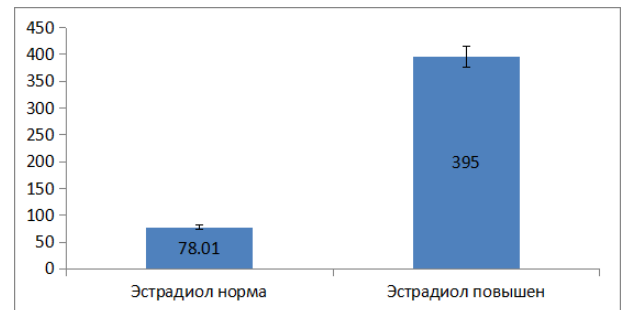
Изучая концентрацию эстрадиола, у 33,4 % девочек было выявлено повышение гормона в

крови. Норма эстрадиола, разработанная Институтом акушерства и гинекологии для девочек данного возраста, составляет $13,6 - 190,4$ пг/мл [40]. В пределах нормы данный гормон зафиксирован у 66,6% обследуемых (рис. 7,8).



Рисунок 7 – Процент обследованных девочек с разным уровнем гормона эстрадиола (пг/мл) в сыворотке крови

Повышенная концентрации гормона в крови у девочек подростков составила $395 \pm 0,28$ пг/мл. У 66,6 % школьниц не было выявлено отклонений содержания гормона эстрадиола в крови, концентрация данного гормона была в пределах нормы – $78,01 \pm 12,08$ пг/мл.



* – $p \leq 0.05$

Рисунок 8 – Содержание эстрадиола в сыворотке крови обследованных девочек

Эстрадиол является наиболее активным эстрагеном. Именно этот гормон отвечает за подготовку организма к беременности, оказывая влияние на рост и развитие яйцеклетки, созревание фолликулов [41, 42].

Повышение данного гормона может быть следствием опухолей и кист яичников. Кроме того, причиной повышения эстрадиола может быть избыточный вес, часто наблюдающийся при СПКЯ. Так же, причиной повышения кон-

центрации в крови эстрадиола может служить не лопнувший фолликул, являющийся следствием нарушения овуляции, или же полным отсутствием овуляции – аменорее.

Зачастую, повышение эстрадиола связано с нарушениями работы щитовидной железы и с повышенной концентрацией тестостерона [43, 44].

Тестостерон – это мужской половой гормон, являющийся предшественником эстрадиола. Под действием фермента цитохром Р450-ароматаза, происходит биосинтез эстрагенов из андрогенов, т.е. превращение тестостерона в эстрадиол [45, 46]. Кроме того, важную роль в превращении тестостерона в эстрадиол играет ФСГ, именно поэтому, любое нарушение ФСГ тестостерона или эстрадиола ведет к сбою всей эндокринной системы организма.

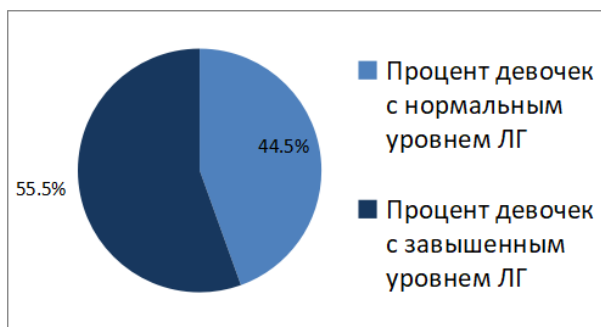
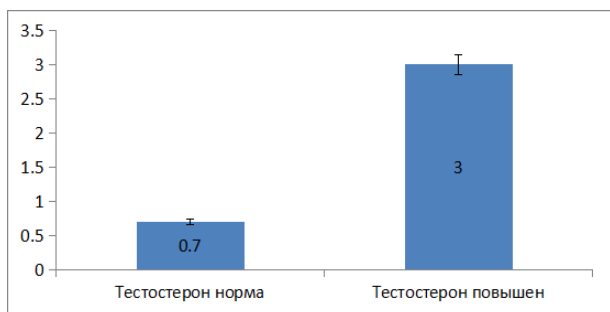


Рисунок 9 – Процент обследованных девочек с разным уровнем гормона тестостерона (нг/мл) в сыворотке крови

У 55,5% обследуемых школьниц тестостерон находился выше нормы и в среднем составил $2,99 \pm 0,12$ нг/мл. 44,5% девочек не имели каких-либо отклонений, средний показатель нормы составил $0,7 \pm 0,07$ нг/мл (рис.9,10).



* – $p \leq 0.05$

Рисунок 10 – Содержание тестостерона в сыворотке крови обследованных девочек

Высокий уровень тестостерона в крови у девочек школьного возраста может быть связан с наличием СПКЯ, опухолей яичников, избыточным весом, а так же неправильным питанием. Повышение тестостерона в крови ведет к повышению уровня эстрадиола, так как основным материалом для его биосинтеза является тестостерон. Следствием этого является аменорея, нарушения менструального цикла, бесплодие.

Проблемы репродуктивного здоровья школьниц так же связаны с нарушениями концентрации гормонов щитовидной железы.

Тиреотропный гормон (ТТГ) – один из важных гормонов щитовидной железы, вырабатываемый непосредственно гипофизом и регулирующий биосинтез тиреоидных гормонов Т3 и Т4. Нехватка или же избыток тиреоидного гормона влияет на половое развитие и репродуктивные функции. Данные гормоны в свою очередь регулируют менструальный цикл.

Согласно нашим исследованиям, у 87,5% обследуемых нарушений не выявлено, и в среднем показатель нормы равен $2,06 \pm 0,11$ мкМЕ/л. 12,5% имели отклонения в сторону повышения ТТГ. Среднее значение повышенного ТТГ составило $3,7 \pm 0,02$ мкМЕ/л (рис. 11,12).

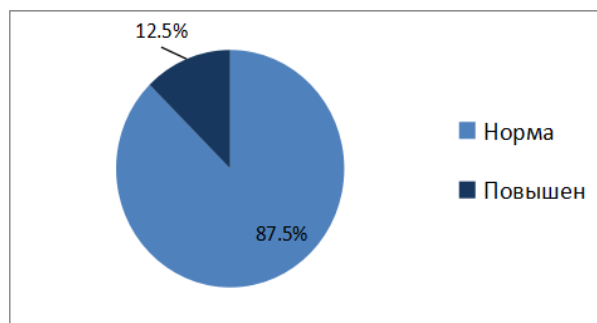
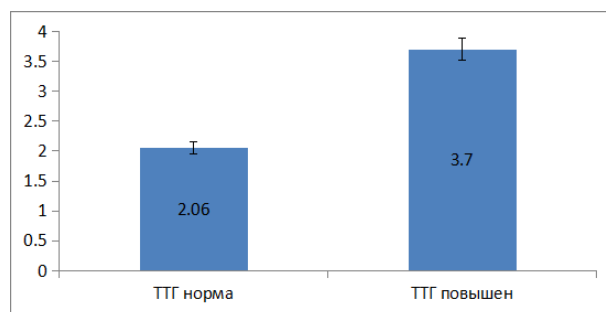


Рисунок 11 – Процент обследованных девочек с разным уровнем гормона ТТГ (мкМЕ/л) в сыворотке крови



* – $p \leq 0.05$

Рисунок 12 – Содержание ТТГ в сыворотке крови обследованных девочек

Высокий уровень ТТГ в сыворотке крови может быть следствием гипофункции щитовидной железы или неправильной работы самого гипофиза. А так же, интенсивные физические нагрузки, психоэмоциональные перегрузки, характерные для подросткового возраста, могут стать причиной увеличения ТТГ [47]. Усиленная секреция ТТГ активизирует обменные процессы, что в свою очередь вызывают гормональные перестройки. Известно, что различные виды гипотиреоза могут приводить задержке полового развития.

Заключение

Таким образом, репродуктивное здоровье подрастающего поколения Казахстана требует большого внимания и является актуальной проблемой современности. Неправильное питание, ГМО продукты, социальные и стрессовые факторы, негативное влияние экологии, все это ставит под удар репродуктивное здоровье детей и подростков. Репродуктивная система является одной из самых чувствительных систем организма подростка. Именно она одной из первых улавливает неблагоприятные воздействия окружающей среды. От 10 до 60 % всех нарушений репродуктивной системы носят антропогенный характер. Даже самые незначительные негативные воздействия внешней среды на детский организм способны вызвать сбой всей репродуктивной системы, что, в свою очередь, ведет к нарушению полового развития.

Одним из основных и самых ранних признаков нарушения работы репродуктивных органов является нарушение синтеза и секреции гонадотропных гормонов.

Цель данной работы состояла в исследовании гипофизарных (ЛГ, ФСГ) и половых (тестостерон, эстрадиол) гормонов в крови у 70 школьниц города Алматы в возрасте от 12 до 16 лет. Для выявления возможных причин гормональных нарушений, был исследован тиреотропный (ТТГ) гормон. Полученные концентрации гормонов, взятых с венозной крови девочек-подростков, были сопоставлены с нормами, что позволило выявить отклонения концентрации в крови школьниц данных гормонов. Была выявлена взаимосвязь гормональных нарушений с неблагоприятным влиянием экологических факторов. Поскольку большую часть рациона подростков составляют ГМО продукты, возможной причи-

ной гормональных отклонений может быть неправильное питание.

Исследования показателей гормонального статуса гипофизарно-гонадной системы не выявили отклонений концентрации ФСГ в крови у девочек-подростков. 50% обследованных девочек имели увеличенное содержания ЛГ. Для более полного анализа состояния репродуктивной системы школьниц, было исследовано соотношение ЛГ/ФСГ. Отношение ЛГ/ФСГ является одним из главных показателей фертильности девочек. 11% школьниц имели уменьшенное значение данного показателя. Соотношение ЛГ/ФСГ выше нормы было зафиксировано у 44,5% девочек-подростков. Причинами данного отклонения могут быть синдром поликистозных яичников (СПКЯ) и недостаточность яичников. Повышенное и пониженное отношение ЛГ/ФСГ ведет к нарушению секреции эстрадиола. Следствием данного нарушения является аменорея и развитие бесплодия.

Изучая концентрацию эстрадиола, было выявлено повышение гормона в крови у 33,4 % девочек. В пределах нормы данный гормон зафиксирован у 66,6% обследуемых девочек. Повышение эстрадиола может быть связано с нарушениями работы щитовидной железы и с повышенной концентрацией тестостерона. Выше нормы гормон тестостерон был зафиксирован у 55,5% обследуемых школьниц, 44,5% девочек не имели отклонений содержания в крови данного гормона.

Высокий уровень тестостерона в сыворотке крови у школьниц может быть связан с наличием СПКЯ, опухолей яичников, избыточным весом, а так же неправильным питанием. Повышение тестостерона в крови ведет к повышению уровня эстрадиола, так как основным материалом для его биосинтеза является тестостерон. Следствием этого является аменорея, нарушения менструального цикла, бесплодие.

Проблемы репродуктивного здоровья школьниц так же связаны с нарушениями концентрации гормонов щитовидной железы. Согласно нашим исследованиям, у 87,5% обследуемых нарушений гормона ТТГ не выявлено, 12,5 % имели повышенное содержание ТТГ в крови.

Данные исследования позволили выявить, что самыми ранними признаками нарушения репродуктивного здоровья девочек школьного возраста являются нарушения синтеза и секреции гормонов, вызванных производственными

загрязнениями и экологическими факторами, не-
правильным питанием.

Дети являются демографическим капиталом
нашей республики, демографическим ресурсом,

именно от здоровья подрастающего поколения
зависит здоровье всей нации. Именно поэтому
репродуктивному здоровью детей школьного
возраста следует уделить большое внимание.

Литература

- 1 Fisher D.A. The Quest diagnostics manual. Endocrinology test selection and interpretation. – CA: Quest Diagnostics Nichols Institute. – 2007. – 369 p.
- 2 Дедов И.И., Семичева Т.В., Петеркова В.А. Половое развитие детей: норма и патология. – М: Медицина, 2002. – С. 50–66.
- 3 Фильгус Т.А., Рудзевич А.Ю., Кукарская И.И. Ювенильные кровотечения в современной популяции детей и подростков // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 6-5. – С. 887-890.
- 4 Корсунский А.А., Гаврилова Л.В., Ильин А.Г., и др. Служба охраны здоровья матери и ребенка в 2002 году. – М., 2002. – 83 с.
- 5 Cameron J.L. Stress and Reproduction // Encyclopedia of Hormones. – USA: Academic Press, 2003. – P. 433–438.
- 6 Уварова Е.В. Репродуктивное здоровье девочек подросткового возраста // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2003. – № 5. – С.8– 9.
- 7 Шилин Д.Е. Синдром изолированного пубархе у девочек // Руководство для эндокринологов. – М. – 1999. – С. 1–19.
- 8 Гендерная статистика Казахстана // МНЭ РК комитет по статистике. URL: <http://gender.stat.gov.kz/ru> (дата обращения: 15.01.2019)
- 9 Country comparison: birth rate // The world factbook. – 2008.
- 10 URL: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/345rank.html> (дата обращения: 26.01.2020.)
- 11 Анартаева М.У. Роль социально-гигиенических факторов, влияющих на репродуктивное здоровье женщин Южно-Казахстанской области // Мед. Журн.Казахстана. – 2004. – №1. – С. 7-9.
- 12 Caserta D, Maranghi L, Mantovani A, Marci R, Maranghi F, Moscarini M. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. – Human Reproduction Update. – 2008. – Vol. 14(1). – P. 59-72.
- 13 Запущен сайт со сведениями о загрязненности воздуха города алматы // Информбюро. – 2018. URL: <https://informburo.kz/novosti/zapushchen-sayt-so-svedeniyami-o-zagryaznyonosti-ozduha-almaty-.html> (дата обращения: 12.09.2019.)
- 14 Экологическая обстановка в Алматы подошла к критическому уровню // Московский комсомолец Казахстан. – 2017. URL: <http://mk-kz.kz/articles/2017/11/15/ekologicheskaya-obstanovka-v-almaty-podoshla-k-kriticheskomu-urovnyu.htm> (дата обращения: 20.05.2018.)
- 15 Мотузко Н.С., Никитин Ю.И. Физиология гипоталамо-гипофизарно-оваральной системы: учеб.-метод. пособие. – Витебск: ВитГАВМ. – 2002. – С.89
- 16 Научно-практический журнал Казахской Ассоциации репродуктивной медицины / Под редакцией Локшина В.Н. – Алматы, ТОО «МедМедиа Казахстан», 2010. – № 3-4 (04-05). – 48 с.
- 17 Caserta D, Maranghi L, Mantovani A, Marci R, Maranghi F, Moscarini M. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. – Human Reproduction Update. – 2008. – Vol. 14, №1. – P. 59–72.
- 18 Caranaugh D. Menstrual irregularities in athletic women may be predictable based on protraining menses / D. Caranaugh, A. Kanonchoff, R. Bartels // The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness. –1999. – Vol. 29, № 12. – P. 163–169.
- 19 Vabre P, Gatimel N, Moreau J et al. Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. – Environmental Health. – 2017. – P. 16–37.
- 20 Betts K.S. Unwelcome guest // Environ. Health Persp. – 2008. – Vol. 116. – P. 363-366.
- 21 Bucher J.R. Bisphenol A. Where to now? – Environ. Health Persp. – 2009. – Vol. 117. –P. 96-97.
- 22 Сергеев О.В., Ревич. Б., Сахаров И.В. и др. Содержание ПХДД/ ПХДФ на территории завода, выпускавшего пестициды, и 10 лет реабилитационных программ // Вестник Рос. ВМА. – 2008. – № 3, прил. 2, ч. 1. – С. 90.
- 23 Чем опасны ГМО // Новости. Телеканал Мир24. URL: <https://mir24.tv/news/14442250/chem-opasny-gmo> (Дата обращения: 12.01.2020)
- 24 ГМО // The Village.ru URL: <https://www.the-village.ru/village/food/true-or-false-food/239621-gmo> (Дата обращения: 12.01.2020)
- 25 Birch A.N.E., Geoghegan I.E., Majerus M.E.N., Hackett C., Allen J.//Vet Hum Toxicol. –2003. – Vol. 45(2). – P.68.
- 26 Losey J.E., Rayer L.S., Carter M.E.// Nature. – 1999. – P.214.
- 27 World Scientists Statement. Supplementary Information of the Hazards of Genetic Engineering Biotechnology. – Third World Network. – 2000.
- 28 Netherwood T., Bowden R., Harrison P., O'Donnell A.G., Parker D.S., Gilbert H.J.Gene// Appl Environ Microbiol. – 1999. – Vol. 65(11). – P. 5139.
- 29 Ермакова И.В. Влияние сои с геном EPSPS CP4 на физиологическое состояние и репродуктивные функции крыс в первых двух // Современные проблемы науки и образования. – 2009. – № 5.

- 30 В Европе завершили эксперимент влияния ГМО продуктов на крысах. URL: [https://delo.ua/economy and politicsinukraine/v-evrope-zavershili-eksperiment-gmo-produktov-na-kryсах-185527/](https://delo.ua/economy-and-politicsinukraine/v-evrope-zavershili-eksperiment-gmo-produktov-na-kryсах-185527/) (Дата обращения: 7.02.2020)
- 31 А. Каримова ГМО – всему голова. URL: <https://www.kommersant.ru/doc/1519871> (Дата обращения: 18.12.2019)
- 32 Druckmann R., Druckmann M.A. Progesterone and immunology of pregnancy // *J. Steroid Biochem Mol.Biol.* – 2005. – Vol. 5, No 97. – P. 389-96.
- 33 Bohring C., Krause W. Immune infertility: towards a better understanding a sperm (auto)-immunity // *Human Reproduction.* – 2003. – Vol. 18, № 5. – P. 915-924.
- 34 Ericson GF. Ovarian anatomy and physiology. Menopause. Biology and pathobiology / Ed Lobo RA, Kelsey J, Marcus R. – San Diego: Academic Press. – 2000. – P. 13-32.
- 35 Н.С.Мотузко, Ю.И.Никитин Физиология гипоталамо-гипофизарно-оваральной системы: учеб.-метод. пособие. – Витебск: ВитГАВМ. – 2002. – С. 9.
- 36 Ericson GF. Menopause. Biology and pathobiology / Ed Lobo RA, Kelsey J, Marcus R. – San Diego: Academic Press. – 2000. – P. 12.
- 37 Jerome F. Strauss Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathology, Pathophysiology and Clinical Management. – 6th ed. – Saunders Elsevier, 2009. – 803-814 p.
- 38 Бочкарева Н.В. Вопросы гинекологии и акушерства // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* – 2003. – Т. 2, №1. – С. 57-60.
- 39 Аканов А.А. Оценка репродуктивного здоровья женщин в Республике Казахстан // *Денсаулық сақтауды дамыту журналы.* – 2008. – Т. 4, №1. – С. 63-65.
- 40 JoAnn V. Pinkerton, MD, University of Virginia Health System URL:<https://www.msmanuals.com/ru/> (Дата обращения: 18.12.2019)
- 41 Эстрадиол. Медицинский центр Биомедика Плюс URL: <https://biomedica.by/estradiol.html> (Дата обращения: 18.12.2019)
- 42 Манушарова Р.А., Черкезова Э.И. Гинекологическая эндокринология: Руководство для врачей. – М.: МИА. – 2008.
- 43 Парийская Е.Н., Ерофеев Н.П. Физиология эндокринной системы. – СПб.: СпецЛит. – 2013. – 80 с.
- 44 Центр ЭКО URL: <https://www.rf-ivf.ru/konsultatsii-spetsialistov/endokrinologiya/482-fsg-i-lg-sootnoshenie-i-norma.html> (Дата обращения: 18.03.2020)
- 45 Эстрадиол // Википедии – свободная энциклопедия URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%81%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D1%8B> (Дата обращения: 18.03.2020)
- 46 Belgorodsky A., et al. Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence // *Horm Res.* – 2009. – Vol. 72(6). – P.321-330.
- 47 Charlier T.D., et al. Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Vol. 1800(10). – P. 1094-1105.
- 48 Андреева В.О. Состояние репродуктивной системы девочек-подростков при нервной анорексии. URL: <https://www.dissercat.com/content/sostoyanie-reproduktivnoi-sistemy-devochek-podrostkov-pri-nervnoi-anoreksii> (Дата обращения: 3.04.2020)

References

- 1 Fisher D.A. (2007). The Quest diagnostics manual. Endocrinology test selection and interpretation. – CA: Quest Diagnostics Nichols Institute. – 369 p.
- 2 Dedov I.I., Semicheva T.V., Peterkova V.A. (2002). Polovoe razvitie detei: norma i patologii. – М: Meditsina. – S. 50–66.
- 3 Filgus T.A., Rudzevich A.YU., Kukarskaya I.I. (2017). Yuvenilnye krvotocheniya v sovremennoj populyacii detej i podrostkov // *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamentalnyh issledovanij.* – № 6-5. – S. 887-890.
- 4 Korsynskii A.A., Gavrilova L.V., Ilin A.G., i dr. (2002). Slyzba ohrany zdorovia materi i rebenka v 2002 gody. – М. – 83 s.
- 5 Cameron J.L. (2003). Stress and Reproduction // *Encyclopedia of Hormones.* – USA: Academic Press. – P. 433–438.
- 6 Yvarova E.V. (2003). Reproduktyvnoe zdorove devochek podrostkovogo vozrasta // *Rossiiskii vestnik permatologii i pediatrii.* – № 5. – S.8–9.
- 7 Shilin D.E. (1999). Sindrom izolirovannogo pybarhe y devochek // *Rykovodstvo dlia endokrinologov.* – М. – S. 1–19.
- 8 Gendernaya statistika Kazahstana // MNE RK komitet po statistike. URL: <http://gender.stat.gov.kz/ru> (data obrashcheniya: 15.01.2019.)
- 9 Country comparison: birth rate (2018) // *The world factbook*
- 10 URL: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/345rank.html> (data obrashcheniya: 26.01.2020.)
- 11 Anartaeva M.Y. (2004). Rol sotsialno-gigienicheskikh faktorov, vliayiyh na reproduktivnoe zdorove jenin Iyjno-Kazahstanskoi oblasti // *Med. Jyrn.Kazahstana.* – №1. – S. 7-9.
- 12 Caserta D, Maranghi L, Mantovani A, Marci R, Maranghi F, Moscarini M. (2008). Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. – *Human Reproduction Update.* – Vol. 14(1). – P. 59-72.
- 13 Zapushchen sayt so svedeniyami o zagryaznenosti vozduha goroda almaty (2018) // *Informbyuro.* URL: <https://informburo.kz/novosti/zapushchen-sayt-so-svedeniyami-o-zagryaznenosti-ozduha-almaty-.html> (data obrashcheniya: 12.09.2019.)
- 14 Ekologicheskaya obstanovka v Almaty podoshla k kriticheskomu urovnyu (2017) // *Moskovskij komsomelec Kazahstan.* URL:<http://mk-kz.kz/articles/2017/11/15/ekologicheskaya-obstanovka-v-almaty-podoshla-k-kriticheskomu-urovnyu.htm> (data obrashcheniya: 20.05.2018.)

- 15 Motýzko N.S., Nikitin I.Y.I. Fiziologiya gipotalamo-gipofizarno-ovarialnoi sistemy: úcheb.-metod. posobie. – Vitebsk: VitGAVM. – 2002. – S.89
- 16 Naychno-prakticheskiy jýrnal Kazahstanskoi Assotsiatsii reproduktivnoi meditsiny / Pod redaktsiei Lokshina V.N. – Almaty, TOO «MedMedia Kazahstan», 2010. – № 3-4 (04-05). – 48 s.
- 17 Caserta D, Maranghi L, Mantovani A, Marci R, Maranghi F, Moscarini M. (2008). Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. – *Human Reproduction Update*. – Vol. 14, №1. – P. 59–72.
- 18 Caranagh D. (1999). Menstrual irregularities in athletic women may be predictable based on protraining menses / D. Caranagh, A. Kanonchoff, R. Bartels // *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. – Vol. 29, № 12. – P. 163–169.
- 19 Vabre P, Gatimel N, Moreau J et al. (2017). Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. – *Environmental Health*. – P. 16–37.
- 20 Betts K.S. (2008). Unwelcome guest // *Environ. Health Persp.* – Vol. 116. – P. 363-366.
- 21 Bucher J.R. Bisphenol A. (2009). Where to now? – *Environ. Health Persp.* – Vol. 117. –P. 96-97.
- 22 Sergeev O.V., Revich. B., Saharov I.V. i dr. (2008). Soderzhanie PHDD/ PHDF na territorii zavoda, v okruzhayushchej srede i produktah pitaniya CHapaevska posle polnoj ostanovki zavoda, vypuskavshego pesticidy, i 10 let reabilitacionnyh programm // *Vestnik Ros. VMA.* – № 3, pril. 2, ch. 1. – S. 90.
- 23 Chem opasny GMO // *Novosti. Telekanal Mir24.* URL: <https://mir24.tv/news/14442250/chem-opasny-gmo> (Data obraennia: 12.01.2020)
- 24 GMO // *The Village.ru* URL: <https://www.the-village.ru/village/food/true-or-false-food/239621-gmo> (Data obraennia: 12.01.2020)
- 25 Birch A.N.E., Geoghegan I.E., Majerus M.E.N., Hackett C., Allen J. (2003) // *Vet Hum Toxicol.* – Vol. 45(2). – P.68.
- 26 Losey J.E., Rayor L.S., Carter M.E. (1999) // *Nature.* – P.214.
- 27 World Scientists Statement (2000). Supplementary Information of the Hazards of Genetic Engineering Biotechnology. – Third World Network.
- 28 Netherwood T., Bowden R., Harrison P., O'Donnell A.G., Parker D.S., Gilbert H.J. Gene (1999) // *Appl Environ Microbiol.* – Vol. 65(11). – P. 5139.
- 29 Ermakova I.V. (2009). Vliyanie soi s genom EPSPS CP4 na fiziologicheskoe sostoyanie i reproduktivnye funktsii krysa v pervyh dvuh // *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* – № 5.
- 30 V Evrope zavershili eksperiment vliyania GMO produktov na kryсах. URL: <https://delo.ua/economyandpoliticsinukraine/v-evrope-zavershili-eksperiment-gmo-produktov-na-kryсах-185527/> (Data obraennia: 7.02.2020)
- 31 A. Karimova GMO – vsemy golova. URL: <https://www.kommersant.ru/doc/1519871> (Data obraennia: 18.12.2019)
- 32 Druckmann R., Druckmann M.A. (2005). Progesterone and immunology of pregnancy // *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* – Vol. 5, No 97. – P. 389-96.
- 33 Bohring C., Krause W. (2003). Immune infertility: towards a better understanding a sperm (auto)-immunity // *Human Reproduction.* – Vol. 18, № 5. – P. 915-924.
- 34 Ericson GF. (2000). Ovarian anatomy and physiology. Menopause. Biology and pathobiology / Ed Lobo RA, Kelsey J, Marcus R. – San Diego: Academic Press. – P. 13-32.
- 35 N.S.Motuzko, YU.I.Nikitin (2002). Fiziologiya gipotalamo-gipofizarno-ovarial'noj sistemy: ucheb.-metod. posobie. – Vitebsk: VitGAVM. – S. 9.
- 36 Ericson GF. (2000). Menopause. Biology and pathobiology / Ed Lobo RA, Kelsey J, Marcus R. – San Diego: Academic Press. – P. 12.
- 37 Jerome F. Strauss Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathology, Pathophysiology and Clinical Management. – 6th ed. – Saunders Elsevier, 2009. – 803-814 p.
- 38 Bochkareva N.V. (2003). Voprosy ginekologii i akusherstva // *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii.* – T. 2, №1. – S. 57-60.
- 39 Akanov A.A. (2008). Ocenka reproduktivnogo zdorov'ya zhenshchin v Respublike Kazahstan // *Densaulyk saқтауды damy-tu zhurnaly.* – T. 4, №1. – S. 63-65.
- 40 JoAnn V. Pinkerton, MD, University of Virginia Health System URL: <https://www.msmanuals.com/ru/> (Data obraennia: 18.12.2019)
- 41 Estradiol. Meditsinskiy tsentr Biomedika Plýs URL: <https://biomedica.by/estradiol.html> (Data obraennia: 18.12.2019)
- 42 Manusharova R.A., Cherkezova E.I. (2008). Ginekologicheskaya endokrinologiya: Rukovodstvo dlya vrachej. – M.: MIA.
- 43 Parijskaya E.N., Erofeev N.P. (2013). Fiziologiya endokrinnoj sistemy. – Spb.: SpecLit. – 80 s.
- 44 Tsentri EKO URL: <https://www.rf-ivf.ru/konsultatsii-spetsialistov/endokrinologiya/482-fsg-i-lg-sootnoshenie-i-norma.html> (Data obraennia: 18.03.2020)
- 45 Estradiol // *Vikipediya – svobodnaya entsiklopediya* URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%81%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D1%8B> (Data obraennia: 18.03.2020)
- 46 Belgorodsky A., et al. (2009). Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence // *Horm Res.* – Vol. 72(6). – P.321-330.
- 47 Charlier T.D., et al. (2010). Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain // *Biochim Biophys Acta.* – Vol. 1800(10). – P. 1094-1105.
- 48 Andreeva V.O. Sostoyanie reproduktivnoi sistemy devochek-podrostkov pri nervnoi anoreksii. URL: <https://www.dissertat.com/content/sostoyanie-reproduktivnoi-sistemy-devochek-podrostkov-pri-nervnoi-anoreksii> (Data obraennia: 3.04.2020)

6-бөлім
ЗООЛОГИЯ

Section 6
ZOOLOGY

Раздел 6
ЗООЛОГИЯ

П.А. Есенбекова¹, М.Ж. Байжүніс², Г.Д. Анарбекова²¹Институт зоологии КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы²Казахский Агроуниверситет, Казахстан, г. Алматы, e-mail: esenbekova_periz@mail.ru**ДЕНДРОБИОНТНЫЕ ПОЛУЖЕСТКОКРЫЛЫЕ (heteroptera)
ЧАРЫНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО НАЦИОНАЛЬНОГО
ПРИРОДНОГО ПАРКА (Юго-Восточный Казахстан)**

В статье приводятся результаты полевых исследований 2019 г. на территориях Чарынского ГНПП. В результате проведенных исследований выявлено 65 видов полужесткокрылых из 10 семейств: Nabidae (8 видов), Anthocoridae (9 видов), Reduviidae (3 вида), Miridae (24 вида), Aradidae (2 вида), Lygaeidae (1 вид), Coreidae (2 вида), Tingidae (3 вида), Acanthosomatidae (4 вида), Pentatomidae (10 видов). По трофической специализации выделяются зоофаги (29 видов), зоофитофаги (11 видов), фитофаги (23 вида) и мицетофаги (2 вида). По числу поколений в год разделяются на 4 группы: моновольтинные (44 вида), бивольтинные (11 видов), поливольтинные (7 видов), ациклические (2 вида), у 1 вида неизвестно число поколений. Выделены следующие экологические группы видов: мезофилы (98%), ксерофилы (2%). Среди древесных полужесткокрылых Чарынского ГНПП в стадии имаго зимуют 36 видов (56%), в стадии имаго и личинки – 3 вида (4%), в стадии личинки – 2 вида (3%), а в стадии яйца – 24 вида (37%). 2 вида включены в Красную книгу Алматинской области: *Arma custos* (Fabricius, 1794) и *Zicrona caerulea* (Linnaeus, 1758).

Ключевые слова: дендробионтные полужесткокрылые, Чарынский Государственный национальный природный парк, Юго-Восточный Казахстан.

P.A. Esenbekova¹, M.Zh. Bayzhunis², G.D. Anarbekova²¹Institute of Zoology KN MES RK, Kazakhstan, Almaty²Kazakh Agricultural University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: esenbekova_periz@mail.ru**Dendrobiont half-winged (heteroptera)
Charyn state national natural park (South-East Kazakhstan)**

The article presents the results of field studies in 2019 in the Charyn GNPP. As a result of the studies, 65 species of half-winged from 10 families were identified: Nabidae (8 species), Anthocoridae (9 species), Reduviidae (3 species), Miridae (24 species), Aradidae (2 species), Lygaeidae (1 species), Coreidae (2 species), Tingidae (3 species), Acanthosomatidae (4 species), Pentatomidae (10 species). According to trophic specialization, zoophages (29 species), zoophytophages (11 species), phytophages (23 species) and mycetophages (2 species) are distinguished. By the number of generations per year, they are divided into 4 groups: monovoltine (44 species), bivoltine (11 species), polyvoltine (7 species), acyclic (2 species), the number of generations is unknown in 1 species. The following ecological groups of species were identified: mesophiles (98%), xerophiles (2%). Among arboreal semi-winged animals of the Charyn GNPP, 36 species (56%) winter in the adult stage, 3 species (4%) in the adult and larva stages, 2 species (3%) in the adult stage, and 24 species in the egg stage (37%). 2 species are included in the Red Book of the Almaty region: *Arma custos* (Fabricius, 1794) and *Zicrona caerulea* (Linnaeus, 1758).

Key words: dendrobiontic semi-rigid winged animals, Charyn State National Natural Park, South-East Kazakhstan.

П.А. Есенбекова¹, М.Ж. Байжүніс², Г.Д. Анарбекова²¹ҚР БҒМ ҒК Зоология институты, Қазақстан, Алматы қ.²Қазақ Агроуниверситеті, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: esenbekova_periz@mail.ru**Шарын мемлекеттік ұлттық табиғи паркінің дендробионтты
жартылай қаттықанаттылары (heteroptera) (Оңтүстік-Шығыс Қазақстан)**

Мақалада Шарын МҰТП территориясында 2019 жылы жүргізілген далалық ғылыми зерттеулер нәтижелері беріліп отыр. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде жартылай қаттықанаттылардың 10 тұқымдасына жататын 65 түр анықталып отыр: Nabidae (8 түр), An-

thocoridae (9 түр), Reduviidae (3 түр), Miridae (24 түр), Aradidae (2 түр), Lygaeidae (1 түр), Coreidae (2 түр), Tingidae (3 түр), Acanthosomatidae (4 түр), Pentatomidae (10 түр). Олар қоректік байланысы жағынан зоофагтар (29 түр), зоофитофагтар (11 түр), фитофагтар (23 түр) және мицетофагтар (2 түр) болып бөлінеді. Шарын МҰТП жартылай қаттықанаттылары жылына беретін ұрпақ санына қарай 4 топқа бөлінеді: моновольтинді (44 түр), бивольтинді (11 түр), поливольтинді (7 түр), ациклді (2 түр), 1 түрдің беретін ұрпақ саны белгісіз. Зерттеу аймағындағы дендробионтты түрлер келесідей экологиялы топтарға бөлінеді: мезофилдер (98%), ксерофилдер (2%). Шарын МҰТП дендробионтты жартылай қаттықанаттыларының ішінде 36 түр (56%) ересек дарасы күйінде, 3 түр (4%) ересек дарасы, дернәсілі күйінде, 2 түр (3%) дернәсілі күйінде, ал 24 түр (37%) жұмыртқалары күйінде қыстайды. 2 түр – *Arma custos* (Fabricius, 1794) и *Zicrona caerulea* (Linnaeus, 1758) Алматы облысының Қызыл кітабына енгізілген.

Түйін сөздер: дендробионтты жартылай қаттықанаттылар, Шарын ұлттық табиғи паркі, Оңтүстік-Шығыс Қазақстан.

Введение

Полужесткокрылые насекомые – один из обширных отрядов, имеют большое значение в природе. Хорошо приспособленные к разнообразным условиям среды, по пищевым связям среди клопов выделяются растительноядные, хищные и виды со смешанным питанием, потребляющие как растительную, так и животную пищу.

Авторы ранее опубликовали статьи по водным полужесткокрылым и жесткокрылым [1, 2], а дендробионтные полужесткокрылые не исследованы.

Цель исследований: Изучение фауны, биологию, экологию и распространению древесных полужесткокрылых на территории Шарынского ГНПП. Поэтому на основе собственных исследований на территории Шарынского Государственного национального природного парка проведены инвентаризация и комплексный анализ фауны дендробионтных полужесткокрылых и составлен аннотированный список.

Методики исследований

Сбор и изучение полужесткокрылых проводились по общепринятым энтомологическим методикам [3-6]. С кустарников и ветвей деревьев клопы собирались сачком; в лесной подстилке, под корой деревьев и различными укрытиями, отлавливались эксгаустером или пинцетом. Пойманные насекомые умерщвлялись в морилке с этилацетатом и раскладывались на ватные матрасики. Для лабораторного изучения полужесткокрылых и определения их видовой принадлежности использовались микроскопы.

Материалом для настоящей работы послужили сборы 2019 г. на территории Шарынского Государственного национального природного парка.

Результаты исследований и обсуждение

Ниже приводится аннотированный список выявленных видов.

Семейство Nabidae

Himacerus apterus (Fabricius, 1798). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын и Темирлик, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; 12-15.07.2019, 3♀, 2♂; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендро-тамнобионт; мезофил; зоофаг [7, 8]; моновольтинный; зимуют яйца.

Nabis siniferus siniferus Hsiao, 1964. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын и Темирлик, 28-29.06.2019, 3♀, 4♂; 12-15.07.2019, 2♀, 2♂; 08-10.08.2019, 2♀, 3♂. Эвритоф; мезофил; зоофаг; моновольтинный [9], зимуют имаго.

Nabis fesus (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, ясенева роца. 28.06.2019, 2♂, 2♀; 30.06.2019, 3♂, 3♀; 12.07.2019, 4♂, 3♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Хортобионт; эвритофный мезофил; зоофаг (широко многоядный вид); моновольтинный; зимует имаго. Летит на свет [10].

Nabis limbatus Dahlbom, 1851. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын и Темирлик, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; ясенева роца. 28.06.2019, 2♂, 1♀; 30.06.2019, 2♂, 2♀; 12.07.2019, 3♂, 2♀; 08-10.08.2019, 2♀, 2♂. Герпетобионт; мезофил [9]; зоофаг; моновольтинный; зимуют яйца.

Nabis pallidus Fieber, 1861. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; 11-12.07.2019, 4♂, 3♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Дендробионт (на тамариске); мезофил; зоофаг; бивольтинный; зимуют имаго [9].

Nabis viridulus Spinola, 1837. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 3♀; 11-12.07.2019, 4♂, 4♀. Дендробионт (на тамариске); мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимуют имаго [9].

Nabis flavomarginatus Scholtz, 1847. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, ясенева роша. 28.06.2019, 3♂, 2♀; 30.06.2019, 2♂, 1♀; пойма р. Чарын, 12-13.07.2019, 4♂, 5♀; 08-10.08.2019, 2♀, 2♂. Хортобионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимует яйца [9].

Nabis rugosus (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 3♀; 11-12.07.2019, 2♂, 3♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Хортобионт (в различных биотопах); мезофил [9]; зоофаг; моновольтинный, имуют имаго.

Семейство Anthocoridae

Anthocoris angularis Reuter, 1884. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, в долинах рек Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 3♀, 4♂; ясенева роша, 11-12.07.2019, 4♂, 2♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Дендробионт мезофил; зоофаг [11]; моновольтинный; зимует имаго. Редок.

Anthocoris confusus Reuter, 1884. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; ясенева роша, 29.06.2019, 3♀, 3♂; 11-12.07.2019, 4♂, 2♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Дендробионт (на различных листовых, иногда на травянистых растениях); мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимует имаго [9].

Anthocoris limbatus Fieber, 1836. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойменные тугай р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; ясенева роша, 29.06.2019, 2♀, 1♂; 10-12.07.2019, 3♂, 2♀. Дендробионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимует имаго.

Anthocoris nemorum (Linnaeus, 1761). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; ясенева роша, 29.06.2019, 2♀, 3♂; 10-12.07.2019, 3♂, 4♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендро-хортобионт; мезофил; зоофаг [12]; поливольтинный; зимует имаго [11].

Anthocoris pilosus (Jakovlev, 1877). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; ясенева роша, 29.06.2019, 2♀, 1♂; 10-12.07.2019, 4♂, 4♀. Хорто-дендробионт, мезофил; зоофаг; поливольтинный; зимует имаго.

Orius laticollis laticollis (Reuter, 1884). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 4♀, 5♂; ясенева роша, 29.06.2019, 2♀, 3♂; 10-12.07.2019, 5♂, 4♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Дендробионт; мезофил; зоофаг (тли, листовошки, трипсы и др.); поливольтинный; зимует имаго [11].

Orius majusculus (Reuter, 1879). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 4♀, 5♂; ясенева роша, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; 10-12.07.2019, 5♂, 5♀. Дендробионт; мезофил; зоофаг; бивольтинный; зимует имаго [11].

Orius minutus (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 5♀, 5♂; ясенева роша, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀; 08-10.08.2019, 4♀, 3♂. Тамно-хортобионт; мезофил; многоядный зоофаг; поливольтинный; зимует имаго [13].

Orius niger (Wolff, 1811). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 2♀; ясенева роша, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; 11-12.07.2019, 4♂, 3♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Хорто-дендробионт; мезофил; зоофаг (различные насекомые); поливольтинный; зимует имаго [11].

Семейство Reduviidae

Empicoris vagabundus (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясенева роша, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀. Дендробионт; мезофил; зоофаг; число поколений неизвестно; зимуют имаго и личинки старших возрастов [14].

Rhynocoris annulatus (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 2♀; ясенева роша, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; 11-12.07.2019, 3♂, 5♀; 08-10.08.2019, 2♀, 2♂. Дендро-хортобионт (на различных деревьях, кустарниках и травянистой растительности); мезофил; многоядный зоофаг; моновольтинный; зимуют личинки IV-V возрастов [15, 16, 17].

Rhynocoris iracundus (Poda, 1761). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясенева роша, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀, 08-

10.08.2019, 2♀, 2♂. Дендробионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимуют личинки старших возрастов [14].

Семейство Miridae

Deraeocoris pilipes (Reuter, 1879). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 4♂; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀; 08-10.08.2019, 2♀, 2♂. Дендробионт; мезофил; зоофитофаг; моновольтинный; зимуют имаго.

Deraeocoris lutescens (Schilling, 1830). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 4♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 2♂, 3♀. Дендробионт; мезофил; зоофитофаг; бивольтинный; зимуют имаго [10].

Lygidea illota (Stal, 1858). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 1♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀; 08-10.08.2019, 2♀, 2♂. Дендробионт (на ивах); мезофил; полифитофаг; моновольтинный [16]; зимуют имаго.

Lygocoris contaminatus (Fallen, 1807). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 1♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; 11-12.07.2019, 2♂, 1♀. Дендробионт; мезофил; полифитофаг; бивольтинный; зимуют яйца [18].

Orthotylus bilineatus (Fallen, 1807). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 1♀, 1♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 2♂, 3♀. Дендробионт (на *Salix*, *Populus tremula*); мезофил; зоофитофаг; моновольтинный; зимуют яйца [17].

Pilophorus perplexus Douglas & Scott, 1875. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 4♂; 11-12.07.2019, 3♂, 1♀. Дендробионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимуют яйца [19].

Alloeomimus unifasciatus (Reuter, 1879). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 4♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; 11-12.07.2019,

3♂, 2♀. Дендробионт (на лиственных деревьях); мезофил; зоофитофаг; моновольтинный; зимуют яйца [18].

Orthotylus eleagni Jakovlev, 1881. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 5♀, 4♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 4♀; 11-12.07.2019, 5♂, 6♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Дендробионт (на лохе); мезофил; зоофитофаг; бивольтинный; зимуют яйца.

Orthotylus virens (Fallen, 1807). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Дендробионт (на ивах); мезофил; зоофитофаг; моновольтинный; зимуют яйца [19].

Atractotomus mali (Meyer-Dur, 1843). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 3♀; 11-12.07.2019, 5♂, 4♀; 08-10.08.2019, 2♀, 3♂. Дендробионт (связан с деревьями и кустарниками из розоцветных); мезофил; зоофитофаг; моновольтинный; зимуют яйца [19].

Atractotomus kolenatii (Flor, 1860). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Дендробионт (связан с деревьями и кустарниками из розоцветных); мезофил; зоофитофаг; моновольтинный; зимуют яйца [18].

Auchenocrepis reuteri Jakovlev, 1876. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Дендробионт; мезофил (пойменные тугаи); узкий олигофитофаг (*Tamarix*, *Myricaria*); моновольтинный; зимуют яйца [19].

Campylomma verbasci (Meyer-Dur, 1843). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 1♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; 11-12.07.2019, 3♂, 2♀. Хорто-дендробионт; мезофил; зоофитофаг; поливольтинный; зимуют яйца [19].

Blepharidopterus angulatus (Fallen, 1807). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 1♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендробионт (на лиственных породах); мезофил; зоофитофаг (питается тлями); моновольтинный; зимуют яйца.

Cylloceria decorata (Kiritschenko, 1931). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 3♀; ясеневая роща, 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Дендробионт (на яблоне, груше, березе, карагаче); мезофил; зоофаг; истребляет тлей [11]; моновольтинный; зимуют яйца [19].

Agnocoris rubicundus (Fallen, 1807). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 1♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 2♀. Дендробионт (на листовых деревьях и кустарниках); мезофил; полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго.

Salicarus concinnus V.G.Putshkov, 1977. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 3♀; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Дендробионт (в пойменных ивниках); мезофил; широкий олигофитофаг (на ивах); моновольтинный; зимуют яйца [19].

Salicarus roseri (Herrich-Schaeffer, 1838). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 1♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 2♀; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀. Дендробионт (на *Salix*); мезофил (пойменные тугаи); широкий олигофитофаг; моновольтинный; зимуют яйца.

Malacocoris chlorizans (Panzer, 1794). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Тамно-дендробионт (на плодовых, листовых деревьях и кустарниках сем. Rosaceae); мезофил; зоофитофаг (мелкие насекомые и другие беспозвоночные); бивольтинный; зимуют яйца.

Tuponia distincta Drapolyuk, 1980. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 3♀; 11-12.07.2019, 5♂, 4♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Тамнобионт; мезофил (в пойменных тугаях); узкий олигофитофаг (на *Tamarix*, *Myricaria*); бивольтинный; зимуют яйца [20].

Tuponia prasina (Fieber, 1864). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Тамнобионт; мезофил (в пойменных тугаях); узкий олигофитофаг (на *Tamarix*, *Myricaria*); бивольтинный; зимуют яйца [19].

Tuponia spinifera Drapolyuk, 1982. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀. Тамнобионт; мезофил (в пойменных тугаях); узкий олигофитофаг (на *Tamarix*, *Myricaria*); бивольтинный; зимуют яйца [21].

Tuponia elegans (Jakovlev, 1867). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 3♀; 11-12.07.2019, 5♂, 6♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Тамнобионт; мезофил (в пойменных тугаях); узкий олигофитофаг (на *Tamarix*, *Myricaria*); бивольтинный; зимуют яйца [21].

Tuponia roseipennis Reuter, 1878. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 4♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; 11-12.07.2019, 5♂, 5♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Тамнобионт; мезофил (в пойменных тугаях); узкий олигофитофаг (на *Tamarix*, *Myricaria*); бивольтинный; зимуют яйца [21].

Семейство Aradidae

Aradus betulae (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 1♀, 1♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 1♂; 11-12.07.2019, 2♂, 2♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендробионт (на больных и погибших листовых деревьях, пораженных трутовиками из группы Polyporacea [22]; мицетофаг; мезофил; ациклический; зимует имаго и личинки всех стадий.

Aradus setiger Kiritschenko, 1913. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 1♂; пойма р. Темирлик, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; 11-12.07.2019, 3♂, 2♀. Дендробионт (на трутовиках, на осине, иве, под корой тополей и белой акации [23]; мезофил, мицетофаг, питается соком грибов; ациклический; зимуют имаго и личинки всех стадий.

Семейство Lygaeidae

Arocatus melanocephalus (Fabricius, 1798). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 5♀, 6♂; 11-12.07.2019, 7♂, 6♀; 08-10.08.2019, 4♀, 3♂. Дендробионт (встречается под корой и на листьях различных деревьев); мезофил; полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго [24].

Семейство Coreidae

Gonocerus patellatus Kiritschenko, 1916. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендробионт (*Rosa* и др.); мезофил; полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго [25].

Gonocerus acuteangulatus Goeze, 1778. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 3♀, 3♂; 11-12.07.2019, 3♂, 2♀; 08-10.08.2019, 1♀, 1♂. Тамно-дендробионт; мезофил; полифитофаг (на лиственных деревьях и кустарниках) [26]; моновольтинный; зимуют имаго.

Семейство Tingidae

Stephanitis pyri (Fabricius, 1775). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 4♂; 11-12.07.2019, 3♂, 4♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Тамно-дендробионт (на деревьях и кустарниках); мезофил; полифитофаг; поливольтинный; зимуют имаго [27].

Monosteira discoidalis (Jakovlev, 1883). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 4♂; 11-12.07.2019, 3♂, 1♀. Дендробионт (на лиственных деревьях); мезофил; широкий олигофитофаг; бивольтинный; зимуют имаго [27].

Monosteira unicostata (Mulsant & Rey, 1852). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 3♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; 11-12.07.2019, 3♂, 2♀. Дендробионт (на туранге, иве, тополе, карагаче); мезофил; широкий олигофитофаг (повреждает листья); бивольтинный; зимуют имаго [27].

Семейство Acanthosomatidae

Acanthosoma haemorrhoidale haemorrhoidale (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Дендро-тамнобионт; мезофил; полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго [28, 29].

Elasmotethus brevis Lindberg, 1934. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП,

пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; 11-12.07.2019, 2♂, 4♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендробионт (на ивах); мезофил; полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго [30].

Elasmotethus interstinctus (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 3♀, 3♂; 11-12.07.2019, 3♂, 2♀. Дендро-тамнобионт; мезофил; полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго [28, 31].

Elasmucha fieberi Jakovlev, 1865. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, Темирлик, 28-29.06.2019, 3♀, 4♂; 11-12.07.2019, 4♂, 5♀; 08-10.08.2019, 2♀, 2♂. Дендро-тамнобионт; мезофил; полифитофаг (на лиственных деревьях); моновольтинный; зимуют имаго [32].

Семейство Pentatomidae

Arma custos (Fabricius, 1794). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 1♀, 2♂; 11-12.07.2019, 2♂, 2♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендро-хортобионт; мезофил; зоофаг (питается различными мелкими членистоногими); моновольтинный; зимуют имаго [28, 31]. Занесен в список Красной книги Алматинской области [21].

Picromerus lewisi Scott, 1874. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; 11-12.07.2019, 2♂, 1♀; 08-10.08.2019, 1♀, 1♂. Дендро-хортобионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимуют яйца [32, 33].

Rhacognatus punctatus (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 1♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; 11-12.07.2019, 1♂, 2♀. Дендробионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимуют имаго. Имаго нового поколения появляется в середине августа [34].

Troilus luridus (Fabricius, 1775). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 1♀, 2♂; 11-12.07.2019, 1♂, 1♀. Дендро-тамнобионт; мезофил; зоофаг [35, 36]; моновольтинный; зимуют имаго.

Pinthaeus sanguinipes (Fabricius, 1781). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский

ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 1♀, 2♂; 11-12.07.2019, 2♂, 1♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендро-гамно-хортобионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимуют имаго [28].

Zicrona caerulea (Linnaeus, 1758). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 1♂; 11-12.07.2019, 1♂, 2♀. Хорто-гамно-дендробионт; мезофил; зоофаг; моновольтинный; зимуют имаго [31]. Занесен в список Красной книги Алматинской области.

Cellobius abdominalis Jakovlev, 1885. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀. Тамнобионт; мезофил (по поймам рек); узкий олигофитофаг (на туранге); моновольтинный; зимуют имаго [37].

Apodiphus integriceps Horvath, 1888. Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂;

пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 1♀, 2♂+ 2 личинки; 11-12.07.2019, 3♂, 3♀; 08-10.08.2019, 2♀, 2♂. Дендробионт (на различных лиственных деревьях); мезофил; полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго. Повреждает шелковицу и джиду [33, 38].

Desertomenida quadrimaculata (Horvath, 1892). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 3♀, 3♂; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 1♂, 2♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 2♀, 2♂; 11-12.07.2019, 3♂, 2♀; 08-10.08.2019, 1♀, 2♂. Дендробионт (на тамирисках и джужгуне); ксерофил (на пойменных тугаях); полифитофаг; моновольтинный; зимуют имаго [39].

Rhaphigaster nebulosa (Poda, 1761). Алматинская обл., Уйгурский район, Чарынский ГНПП, пойма р. Чарын, 28-29.06.2019, 4♀, 3♂+ 3 личинки; пойма р. Темирлик, 29.06.2019, 2♂, 1♀; ясеневая роща, 28-29.06.2019, 3♀, 2♂; 10-12.07.2019, 4♂, 3♀; 08-10.08.2019, 3♀, 2♂. Дендробионт; мезофил; полифитофаг (на различных лиственных деревьях); моновольтинный; зимуют имаго [28, 40].

Таблица 1 – Таксономический состав древесных полужесткокрылых Чарынского ГНПП и их особенности биологии и экологии

Название видов	Экологические группы	Зимующая стадия	Пищевая специализация	Число поколений
Семейство Nabidae				
<i>Himacerus apterus</i> (Fabricius, 1798)	мезофил	яйца	зоофаг	моновольтинный
<i>Nabis sinoferus sinoferus</i> Hsiao, 1964	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Nabis fesus</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Nabis limbatus</i> Dahlbom, 1851	мезофил	яйца	зоофаг	моновольтинный
<i>Nabis pallidus</i> Fieber, 1861	мезофил	имаго	зоофаг	бивольтинный
<i>Nabis viridulus</i> Spinola, 1837	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Nabis flavomarginatus</i> Scholtz, 1847	мезофил	яйца	зоофаг	моновольтинный
<i>Nabis rugosus</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
Семейство Anthocoridae				
<i>Anthocoris angularis</i> Reuter, 1884	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Anthocoris confusus</i> Reuter, 1884	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Anthocoris limbatus</i> Fieber, 1836	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Anthocoris nemorum</i> (Linnaeus, 1761)	мезофил	имаго	зоофаг	поливольтинный
<i>Anthocoris pilosus</i> (Jakovlev, 1877)	мезофил	имаго	зоофаг	поливольтинный
<i>Orius laticollis</i> (Reuter, 1884)	мезофил	имаго	зоофаг	поливольтинный
<i>Orius majusculus</i> (Reuter, 1879)	мезофил	имаго	зоофаг	бивольтинный
<i>Orius minutus</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго	зоофаг	поливольтинный

Название видов	Экологические группы	Зимующая стадия	Пищевая специализация	Число поколений
<i>Orius niger</i> (Wolff, 1811)	мезофил	имаго	зоофаг	поливольтинный
Семейство Reduviidae				
<i>Empicoris vagabundus</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго, личинки	зоофаг	число поколений неизвестно
<i>Rhynocoris annulatus</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	личинки	зоофаг	моновольтинный
<i>Rhynocoris iracundus</i> (Poda, 1761)	мезофил	личинки	зоофаг	моновольтинный
<i>Arma custos</i> (Fabricius, 1794)	мезофил	имаго	зоофаг	
Семейство Miridae				
<i>Deraeocoris pilipes</i> (Reuter, 1879)	мезофил	имаго	зоофитофаг	моновольтинный
<i>Deraeocoris lutescens</i> (Schilling, 1830)	мезофил	имаго	зоофитофаг	бивольтинный
<i>Lygidea illota</i> (Stal, 1858)	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
<i>Lygocoris contaminatus</i> (Fallen, 1807)	мезофил	яйца	полифитофаг	бивольтинный
<i>Orthotylus bilineatus</i> (Fallen, 1807)	мезофил	яйца	зоофитофаг	моновольтинный
<i>Pilophorus perplexus</i> Douglas & Scott, 1875	мезофил	яйца	зоофаг	моновольтинный
<i>Alloeomimus unifasciatus</i> (Reuter, 1879)	мезофил	яйца	зоофитофаг	моновольтинный
<i>Orthotylus eleagni</i> Jakovlev, 1881	мезофил	яйца	зоофитофаг	бивольтинный
<i>Orthotylus virens</i> (Fallen, 1807)	мезофил	яйца	зоофитофаг	моновольтинный
<i>Atractotomus mali</i> (Meyer-Dur, 1843)	мезофил	яйца	зоофитофаг	моновольтинный
<i>Atractotomus kolenatii</i> (Flor, 1860)	мезофил	яйца	зоофитофаг	моновольтинный
<i>Auchenocrepis reuteri</i> Jakovlev, 1876	мезофил	яйца	узкий олигофитофаг	моновольтинный
<i>Campylomma verbasci</i> (Meyer-Dur, 1843)	мезофил	яйца	зоофитофаг	поливольтинный
<i>Blepharidopterus angulatus</i> (Fallen, 1807)	мезофил	яйца	зоофитофаг	моновольтинный
<i>Cyllecoridea decorata</i> (Kiritshenko, 1931)	мезофил	яйца	зоофаг	моновольтинный
<i>Agnocoris rubicundus</i> (Fallen, 1807)	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
<i>Salicarus concinnus</i> V.G.Putshkov, 1977	мезофил	яйца	широкий олигофитофаг	моновольтинный
<i>Salicarus roseri</i> (Herrich-Schaeffer, 1838)	мезофил	яйца	широкий олигофитофаг	моновольтинный
<i>Malacocoris chlorizans</i> (Panzer, 1794)	мезофил	яйца	зоофитофаг	бивольтинный
<i>Tuponia distincta</i> Drapolyuk, 1980	мезофил	яйца	узкий олигофитофаг	моновольтинный
<i>Tuponia prasina</i> (Fieber, 1864)	мезофил	яйца	узкий олигофитофаг	бивольтинный
<i>Tuponia spinifera</i> Drapolyuk, 1982	мезофил	яйца	узкий олигофитофаг	бивольтинный
<i>Tuponia elegans</i> (Jakovlev, 1867)	мезофил	яйца	узкий олигофитофаг	бивольтинный
<i>Tuponia roseipennis</i> Reuter, 1878	мезофил	яйца	узкий олигофитофаг	бивольтинный
Семейство Aradidae				
<i>Aradus betulae</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго, личинки	мицетофаг	ациклический
<i>Aradus setiger</i> Kiritshenko, 1913	мезофил	имаго, личинки	мицетофаг	ациклический
Семейство Lygaeidae				
<i>Arocatus melanocephalus</i> (Fabr., 1798)	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
Семейство Coreidae				
<i>Gonocerus patellatus</i> Kiritshenko, 1916	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный

Название видов	Экологические группы	Зимующая стадия	Пищевая специализация	Число поколений
<i>Gonocerus acuteangulatus</i> Goeze, 1778	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
Семейство Tingidae				
<i>Stephanitis pyri</i> (Fabricius, 1775)	мезофил	имаго	полифитофаг	поливольтинный
<i>Monosteira discoidalis</i> (Jakovlev, 1883)	мезофил	имаго	широкий олигофитофаг	бивольтинный
<i>Monosteira unicostata</i> (Mulsant & Rey, 1852)	мезофил	имаго	широкий олигофитофаг	бивольтинный
Семейство Acanthosomatidae				
<i>Acanthosoma haemorrhoidale</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
<i>Elasmotethus brevis</i> Lindberg, 1934	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
<i>Elasmotethus interstinctus</i> (L., 1758)	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
<i>Elasmucha fieberi</i> Jakovlev, 1865	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
Семейство Pentatomidae				
<i>Arma custos</i> (Fabricius, 1794)	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Picromerus lewisi</i> Scott, 1874	мезофил	яйца	зоофаг	моновольтинный
<i>Rhacognatus punctatus</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Troilus luridus</i> (Fabricius, 1775)	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Pinthaeus sanguinipes</i> (Fabricius, 1781)	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Zicrona caerulea</i> (Linnaeus, 1758)	мезофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Cellobius abdominalis</i> Jakovlev, 1885	мезофил	имаго	узкий олигофитофаг	моновольтинный
<i>Apodiphus integriceps</i> Horvath, 1888	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный
<i>Desertomenida quadrimaculata</i> (Horvath, 1892)	ксерофил	имаго	зоофаг	моновольтинный
<i>Rhapiaster nebulosa</i> (Poda, 1761)	мезофил	имаго	полифитофаг	моновольтинный

Из таблицы 1 видно, что в условиях Чарынского ГНПП выявлено 65 видов полужесткокрылых из 10 семейств, из них зоофаги – 29 видов, зоофитофаги – 11 видов, фитофаги – 23 вида, мицетофаги – 2 вида; моновольтинные – 44 вида, бивольтинные – 11 видов, поливольтинные – 7 видов, ациклические – 2 вида, у 1 вида неизвестно число поколений; мезофилы – 98%, ксерофилы – 2%; из них в стадии имаго зимуют 36 видов, в стадии имаго и личинки – 3 вида, в стадии личинки – 2 вида, а в стадии яйца – 24 вида.

Заключение

Дендробионтные полужесткокрылые обнаружены во всех исследованных территориях Чарынского ГНПП. В результате проведенных исследований выявлено 65 видов полужесткокрылых из 10 семейств: Nabidae – 8 видов, Anthocoridae – 9 видов, Reduviidae – 3 вида, Miridae – 24 вида, Aradidae – 2 вида, Lygaeidae

– 1 вид, Coreidae – 2 вида, Tingidae – 3 вида, Acanthosomatidae – 4 вида, Pentatomidae – 9 видов. Среди них лидирует видовым разнообразием сем. Miridae (24), Pentatomidae (9), Anthocoridae (9), Nabidae (8), в остальных 6 семействах обнаружены по 1-4 вида.

По биологическим особенностям среди полужесткокрылых Чарынского ГНПП по пищевым связям выделяются зоофаги – 29 видов, зоофитофаги – 11 видов, остальные виды фитофаги, из них 12 видов – полифитофаги, 4 – широкие олигофитофаги, 7 – узкие олигофитофаги, 2 – мицетофаги.

По числу поколений в год древесные полужесткокрылые Чарынского ГНПП разделяются на 4 группы: моновольтинные – 44 вида, бивольтинные – 11 видов, поливольтинные – 7 видов, ациклические – 2 вида, число поколений неизвестно – 1 вид.

Выделены следующие экологические группы видов: мезофилы – 98%, ксерофилы – 2%.

Среди древесных полужесткокрылых Чарынского ГНПП в стадии имаго зимуют 36 видов (56%), в стадии имаго и личинки – 3 вида (4%), в стадии личинки - 2 вида (3%), а в стадии яйца – 24 вида (37%).

В условиях Чарынского ГНПП выявлены 65 видов древесных щитников, из них 2 вида включены в Красную книгу Алматинской области: *Arma custos* (Fabricius, 1794) и *Zicrona caerulea* (Linnaeus, 1758).

Литература

- 1 Есенбекова П.А., Нурғалиев А.Е. К фауне водных полужесткокрылых Чарынского природного парка // Вестник КазНУ им. аль-Фараби. – Алматы, 2010. – №1(43). – С. 89-91.
- 2 Есенбекова П.А., Байжанов М.Х., Убраимов А.А. Материалы к осенней фауне хищных водных жесткокрылых реки Или. Труды Чарынского Государственного национального природного парка. Алматы, 2013. Том 1. С. 100-102.
- 3 Кириченко, А. Н. Методы сбора настоящих полужесткокрылых и изучения местных фаун / А. Н. Кириченко, Изд-во АН СССР. – М., Л., 1957. – 124 с.
- 4 Кержнер, И.М., Ячевский, Т.Л. Отряд Hemiptera (Hemiptera) полужесткокрылые. Определитель насекомых европейской части СССР: в пяти томах / И. М. Кержнер, Т. Л. Ячевский. – М., Л. : Наука. – 1964. – Т. 1. – С. 655–845.
- 5 Палий, В.Ф. Методика изучения фауны и фенологии насекомых / В.Ф. Палий. – Воронеж, 1970. – С. 1-192.
- 6 Фасулати, К.К. Полевое изучение наземных беспозвоночных / К.К. Фасулати. – М. 1971. – 424 с.
- 7 Soutwood T.R., Leston L. Land and water bugs of the British Isles. – London. 1959. – 436 p.
- 8 Koschel H. Zur Kenntnis der Raubwanze *Himacerus apterus* F. (Heteroptera, Nabidae). Teil. I, II. // Z. angew. Entomol. – 1971. – Bd. 68. – H. 1. – S. 1-24; H. 2. – S.113-137.
- 9 Кержнер И.М. Полужесткокрылые семейства Nabidae. Насекомые хоботные. // Фауна СССР. – Т. 13. – Вып. 2. – Л. Наука., 1981. – 327 с.
- 10 Есенбекова П.А. К фауне полужесткокрылых долины среднего течения р. Или // Вестник КазНУ. Сер. биологическая. – Алматы, 2006. – № 2 (28). – С. 68-78.
- 11 Элов Э.С. Полужесткокрылые сем. Anthocoridae (Heteroptera) Средней Азии и Казахстана // Энтомолог. обзор. – 1976. – Т. 55. – Вып. 2. – С. 369-380.
- 12 Пучков В.Г. К экологии малоизученных видов полужесткокрылых европейской части СССР. Сообщ. II // Тр. Инст-та зоол. АН УССР. – 1961. – Т. 17. – С. 86-93.
- 13 Есенбекова П.А. Хищные клопы (Heteroptera) Юго-Восточного Казахстана // Tethys Entomol. Research. – 2008. – Vol. XVI. – С. 79-86.
- 14 Пучков В.Г. Полужесткокрылые. Хищнецы. Фауна Украины // Наукова думка. – Киев. 1987. – Т. 21. – Вып. 5. – 248 с.
- 15 Gredler, P. V. M. *Rhynchota Tirolensia I. Hemiptera heteroptera (Wanzen)*. // Verh. Zool. Bot. Ges. Wien. – 1870. – Bd. 20. – S. 69-108.
- 16 Priesner H. *Prodromus zui Hemipteren – fauna von Oberosterreich*. III // Z. Wiss. Insektenbiol. – 1928. – 23, N5/7.-S. 113-120..
- 17 Singer E. Die Wanzen (Hemiptera-Heteroptera) des unteren Maingebiets von Hanau bis Wurzburg mit Einschluss des Spessarts // Mitt. Naturwiss. Mus. Aschaffenburg. N.S. – 1952. – 5.S.1-128.
- 18 Matocq, A., & Pericart, J. 1986. A propos d'un Hémiptère Miride nouveau pour la France: *Psallus kolenatli* (Flor) 1860. L'Entomologiste, 42(2) : 105-111.
- 19 Пучков В.Г. Новые и малоизвестные виды клопов-слепняков (Heteroptera, Miridae) фауны Монголии и Средней Азии // Энтомолог.обозр. – 1977. – Т. 56. – С. 360-374.
- 20 Драполок И.С. Дендрофильные полужесткокрылые (Heteroptera) Большого Кавказа Азербайджана (с обзором клопов-слепняков рода *Turponia* Reut. фауны СССР). Автореф. дисс. соиск. уч. степ. к.б.н. – Баку, 1982. – 27 с.
- 21 Драполок И.С. Обзор клопов-слепняков (Heteroptera, Miridae) фауны СССР и Монголии // Насекомые Монголии. – Вып. 7. – Л.: Изд-во «Наука», 1980. – С. 43-68.
- 22 Канюкова Е.В. Полужесткокрылые рода *Aradus* группы *betulae* (Heteroptera, Aradidae) фауны СССР // Вестн. зоол. – 1984. – № 4. – С. 9-14.
- 23 Кириченко А.Н. Насекомые полужесткокрылые (Insecta, Hemiptera) // Фауна России и сопредельных стран. – Т. 1. – Вып. 1. – СПб, 1913. – 301 с.
- 24 Пучков В.Г. Лігеїди // Фауна України. – Т. 21. – Вып. 3. – Київ: Вид. АН УРСР, 1969. – 388 с.
- 25 Чернова Г.П. Полужесткокрылые (Heteroptera) семейств Coriidae, Alydidae и Stenocephalidae фаун СССР и сопредельных стран: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Л., 1979. – 20 с.
- 26 Moullet P. Hemipteres Coreoidea, Pyrrhocoridae et Stenocephalidae Euro-Mediterraneens. // Federation Francaise des societes de sciences naturelles. – Paris, 1995. – Т. 81. – 336 p.
- 27 Пучков В.Г. Беритиди, червоноклопи, пізматиди, підкорники і тингіди. // Фауна України. – Т.21. – Вип. 4. – Київ, 1974. – 332 с.
- 28 Пучков В.Г. Щитники // Фауна України. – Т. 21. – Вип. 1. – Київ: Вид. АН УРСР, 1961. – 339 с.
- 29 Пучков В.Г. Щитники Средней Азии (Hemiptera, Pentatomidea). – Фрунзе: Илим, 1965. – 329 с.

- 30 Кириченко А.Н., Кержнер И.М. Наземные полужесткокрылые (Heteroptera) Монгольской Народной Республики // *Насекомые Монголии*. – Вып. 1. – Л.: Изд-во «Наука», 1972. – С. 383-428.
- 31 Кириченко А.Н. Полужесткокрылые (Hemiptera-Heteroptera) Кавказского края // *Записки Кавказ. Музея*. – 1918. – Серия А. – № 6. – Часть I. – 177 с.
- 32 Кержнер И.М. Новые и малоизвестные полужесткокрылые (Heteroptera) из Казахстана и других районов СССР // *Тр. Зоол. инст-та АН СССР*. (Новые виды насекомых фауны Казахстана). – 1964. – Т. 34. – С. 113-130.
- 33 Гидаев Д.А. Полужесткокрылые группы пентатомоморфа Азербайджана. – Баку: Изд-во «Элм», 1982. – 160 с.
- 34 Йосифов М. Heteroptera, Pentatomoidea. II // *Фауна на България*. – Т. 12. – София, 1981. – С. 1-205.
- 35 Butler E.A. A Biology of the British Hemiptera-Heteroptera. – London: Witherby, 1923. – P. i-vii, 1-682.
- 36 Thomas, D.B., Jr. Taxonomic synopsis of the Old World asopine genera (Heteroptera: Pentatomidae) // *Insecta Mundi*. – 1994. – Vol. 8(3-4). – P. 145-212.
- 37 Кержнер И.М. Новые и малоизвестные виды Heteroptera из Монголии и сопредельных районов СССР. III // *Насекомые Монголии*. – Вып. 4. – Л.: Наука, 1976. – С. 30–86.
- 38 Асанова Р.Б. Полужесткокрылые древесной и кустарниковой растительности Казахстана // *Материалы 1-й науч. конференции молодых спец-в и аспирантов. Мин-во с/х Каз ССР, КазИЗР*. – АлмаАта: Мин. сельхоз. Каз ССР, КазИЗР, 1969. – С.10-12.
- 39 Есенбекова П.А. Полужесткокрылые (Heteroptera) Казахстана. – Алматы: «Нур-Принт», 2013. – 268 с.
- 40 Поливанова Е.Н. Эколого-морфологические особенности клопов надсемейства Pentatomoidae в южных зерновых районах европейской части СССР // *В кн.: Вредная черепашка*. – Т. 4. – М., 1960. – С. 157-221.

References

- 1 Esenbekova P.A., Nurkaliev A.E. To the fauna of aquatic semi-winged Charyn natural park // *Bulletin of KazNU named after al-Farabi*. – Almaty, 2010. – No. 1 (43). – S. 89-91. 2.
- 2 Esenbekova P.A., Bayzhanov M.Kh., Ubraitimov A.A. Materials for the autumn fauna of predatory aquatic beetles of the Ili River. *Proceedings of the Charyn State National Natural Park*. Almaty, 2013. Volume 1. S. 100-102.
- 3 Kirichenko, A. N. Methods for collecting true half-winged animals and studying local faunas / A. N. Kirichenko, Publishing House of the USSR Academy of Sciences. – M., L., 1957. – 124 p.
- 4 Kerzhner, I.M., Yachevsky, T.L. Order Heteroptera (Hemiptera) Semi-winged. Key to insects of the European part of the USSR: in five volumes / I. M. Kerzhner, T. L. Yachevsky. – M., L.: Science. – 1964. – Т. 1. – S. 655–845.
- 5 Paly, V.F. Methods of studying the fauna and phenology of insects / V.F. Paly. – Voronezh, 1970. – S. 1-192.
- 6 Fasulati, K.K. Field study of terrestrial invertebrates / K.K. Fasulati. – M. 1971. – 424 p.
- 7 Soutwood T.R., Leston L. Land and water bugs of the British Isles. – London. 1959. – 436 p.
- 8 Koschel H. Zur Kenntnis der Raubwanze *Himacerus apterus* F. (Heteroptera, Nabidae). Teil. I, II. // *Z. angew. Entomol.* – 1971. – Bd. 68. – H. 1. – S. 1-24; H. 2. – S.113-137.
- 9 Kerzhner I.M. Semi-winged family Nabidae. Proboscis insects. // *Fauna of the USSR*. – Т. 13. – Vol. 2. – L. Nauka., 1981. – 327 p.
- 10 Esenbekova P.A. To the fauna of semi-winged valleys of the middle reaches of the river. Or // *Bulletin of KazNU. Ser. biological*. – Almaty, 2006. – No. 2 (28). – S. 68-78.
- 11 Elov E.S. Semi-winged sem. Anthocoridae (Heteroptera) of Central Asia and Kazakhstan // *Entomol. review* – 1976. – Т. 55. – Issue. 2. – S. 369-380.
- 12 Puchkov V.G. On the ecology of little-studied species of half-winged European part of the USSR. *Message II* // *Tr. Inst-zoo. USSR Academy of Sciences*. – 1961. – Т. 17. – S. 86-93.
- 13 Esenbekova P.A. Predatory bugs (Heteroptera) of South-East Kazakhstan // *Tethys Entomol. Research*. – 2008. – Vol. Xvi. – С. 79-86.
- 14 Puchkov V.G. Semi-winged. Predators. *Fauna of Ukraine* // *Naukova Dumka*. – Kiev. 1987. – Т. 21. – Vol. 5. – S. 248 s.
- 15 Gredler, P. V. M. *Rhynchota Tirolensia I. Hemiptera heteroptera (Wanzen)*. // *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien*. – 1870. – Bd. 20. – S. 69-108.
- 16 Priesner H. *Prodromus zui Hemipteren – fauna von Oberosterreien*. III // *Z. Wiss. Insektenbiol.* – 1928. – 23, N5/7.-S. 113-120..
- 17 Singer E. Die Wanzen (Hemiptera-Heteroptera) des unteren Maingebiets von Hanau bis Wurzburg mit Einschluss des Spessarts // *Mitt. Naturwiss. Mus. Aschaffenburg*. N.S. – 1952. – 5.S.1-128.
- 18 Matocq, A., & Pericart, J. 1986. A propos d'un Hémiptère Miride nouveau pour la France: *Psallus kolenatli* (Flor) 1860. *L'Entomologiste*, 42(2): 105-111.
- 19 Puchkov V.G. New and little-known species of horsefly bugs (Heteroptera, Miridae) of the fauna of Mongolia and Central Asia // *Entomol.* – 1977. – Т. 56. – S. 360-374.
- 20 Drapolyuk I.S. Heteroptera dendrophilic semi-winged (Heteroptera) of the Greater Caucasus of Azerbaijan (with an overview of horse-bug bugs of the genus *Tuponia* Reut. *Fauna of the USSR*). Abstract. diss. competition. student step. Ph.D. – Baku, 1982.- 27 p.
- 21 Drapolyuk I.S. Overview of horsefly bugs (Heteroptera, Miridae) of the fauna of the USSR and Mongolia // *Insects of Mongolia*. – Vol. 7. – L.: Publishing House "Science", 1980. – S. 43-68.

- 22 Kanyukova E.V. Semi-winged genus *Aradus* of group *betulac* (Heteroptera, Aradidae) of the fauna of the USSR // *Vestn. zoo.* – 1984. – No. 4. – S. 9-14.
- 23 Kirichenko A.N. Semi-winged insects (Insecta, Hemiptera) // *Fauna of Russia and neighboring countries.* – T. 1. – Vol. 1.-SPb, 1913.- 301 s.
- 24 Puchkov V.G. Ligeidi // *Fauna of Ukraine.* – T. 21. – Issue. 3. – Kiev: View. AN URSR, 1969 .-- 388 p.
- 25 Chernova G.P. Heteroptera of the families Coriidae, Alydidae and Stenocephalidae of the faunas of the USSR and neighboring countries: Abstract. dis ... cand. biol. sciences. – L., 1979. – 20 p.
- 26 Moullet P. Hemipteres Coreoidea, Pyrrhocoridae et Stenocephalidae Euro-Mediterraneens. // *Federation Francaise des societies de sciences naturelles.* – Paris, 1995. – T. 81. – 336 p.
- 27 Puchkov V.G. Beritidi, chervonoklopi, pizmatidi, p_dkorniki i tingidi. // *Fauna of Ukraine.* – T. 21. – VIP. 4. – Kiev, 1974. – 332 s.
- 28 Puchkov V.G. Shields // *Fauna of Ukraine.* – T. 21. – VIP. 1. – Kiev: View. AN URSR, 1961 .- 339 p.
- 29 Puchkov V.G. Shieldmen of Central Asia (Hemiptera, Pentatomidea). – Frunze: Ilim, 1965 .- 329 p.
- 30 Kirichenko A.N., Kerzhner I.M. Ground Hemiptera (Heteroptera) of the Mongolian People's Republic // *Insects of Mongolia.* – Issue 1. – L.: Publishing house "Science", 1972. – S. 383-428.
- 31 Kirichenko A.N. Hemiptera (Hemiptera-Heteroptera) of the Caucasus region // *Notes of the Caucasus. Museum:* – 1918. – Series A.- No. 6. – Part I. – 177 p.
- 32 Kerzhner I.M. New and little-known half-winged (Heteroptera) from Kazakhstan and other regions of the USSR // *Tr. Zool. Institute of the Academy of Sciences of the USSR. (New species of insects of the fauna of Kazakhstan).* – 1964. – T. 34. – S. 113-130.
- 33 Gydayatov D.A. Semi-winged groups of the pentatomomorph of Azerbaijan. – Baku: Elm Publishing House, 1982. – 160 p.
- 34 Yosifov M. Heteroptera, Pentatomoidea. II // *Fauna in Bulgaria.* – T. 12. – Sofia, 1981. – S. 1-205.
- 35 Butler E.A. *A Biology of the British Hemiptera-Heteroptera.* – London: Witherby, 1923. – P. i-vii, 1-682.
- 36 Thomas, D.B., Jr. Taxonomic synopsis of the Old World asopine genera (Heteroptera: Pentatomidae) // *Insecta Mundi.* – 1994. – Vol. 8(3-4). – P. 145-212.
- 37 Kerzhner I.M. New and little-known species of Heteroptera from Mongolia and neighboring regions of the USSR. III // *Insects of Mongolia.* – Vol. 4. – L.: Nauka, 1976. – S. 30–86.
- 38 Asanova R.B. Semi-winged wood and shrub vegetation of Kazakhstan // *Materials of the 1st scientific conference of young specialists and graduate students. The Ministry of Agriculture of the Kazakh SSR, KazIZR.* – AlmaAta: Min. agricultural. Kaz SSR, KazIZR, 1969. – S.10-12.
- 39 Esenbekova P.A. Heteroptera of Kazakhstan. – Almaty: “Nur-Print”, 2013. – 268 p.
- 40 Polivanova E.N. Ecological and morphological features of bugs of the superfamily Pentatomoidae in the southern grain regions of the European part of the USSR // *In the book: Harmful turtle.* – T. 4. – M., 1960 .- S. 157-221.

МАЗМҰНЫ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

1-бөлім Ботаника	Section 1 Botany	Раздел 1 Ботаника
<i>Қалиев Б.Ш., Ситпаева Г.Т., Үсен Қ., Сайкенов Б.Р.</i>		
		Жетісу Алатауы солтүстік макробеткейінің аласа және орташатауларындағы өсімдікжабын типтері.....4
<i>Рамазанова М.С., Грудзинская Л.М., Гемеджиева Н.Г.</i>		
		Интродукция казахстанских видов ирисов.....14
<i>Шадманова Л.Ш., Ситпаева Г.Т., Фризен Н.</i>		
		Оценка генетического разнообразия <i>Malus sieversii</i> Джунгарской популяции In Situ и Ex Situ с использованием ISSR-PCR маркеров23
2-бөлім Биотехнология	Section 2 Biotechnology	Раздел 2 Биотехнология
<i>Абеуова Л.С., Қали Б.Р., Рахимжанова А.О., Беккужина С.С., Манабаева Ш.А.</i>		
		Особенности прямой регенерации отечественных сортов картофеля в культуре in vitro.....34
<i>Abdieva G.Zh., Ualieva P.S, Malik A.M., Artmann A.T., Akimbekov N.Sh.</i>		
		Selection of pops degrading microorganisms and their molecular genetic identification42
<i>Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К., Төреханова М.М., Бауенова М.Ө., Адақ А., Карабекова А., Заядан Б.К.</i>		
		Влияние <i>Chlorella vulgaris</i> z-1 на микробный состав рыбохозяйственных сточных вод.....53
<i>Абделиев Б.З., Есимсейт Д.Т., Абдирасилова А.А., Касенова А.К., Абдел З.Ж., Рысбекова А.К., Атиабар Б.Б., Мирзатаев Ж.К., Чунетова Ж.Ж.</i>		
		Результаты обследования искусственных водных систем гостиничных комплексов города Алматы на контаминированность <i>Legionella pneumophila</i>64
<i>Айтжанова А.А., Олейникова Е.А., Саубенова М.Г., Даугалиева С.Т., Бержанова Р.Ж.</i>		
		Отбор антагонистически активных штаммов молочнокислых бактерий из молока различных видов животных72
3-бөлім Иммунология	Section 3 Immunology	Раздел 3 Иммунология
<i>Останчук Е.О., Мухатаев Ж.Е., Перфильева Ю.В.</i>		
		Фенотипический анализ Т-регуляторных клеток периферической крови больных витилиго 84
4-бөлім Молекулалық биология және генетика	Section 4 Molecular biology and genetics	Раздел 4 Молекулярная биология и генетика
<i>Бармак С.М., Бердығалиев А.Б., Синяевский Ю.А., Серикбай А.А., Савицкая И.С., Шарманов Т.Ш., Менденхалл И.Х., Жолдыбаева Е.В.</i>		
		Разработка метода ПЦР для выявления ДНК <i>Salmonella enterica</i> 94
<i>Исабек А.У., Садикалиева С.О., Бурашев Е.Д., Червякова О.В., Касенов М.М., Султанкулова К.Т.</i>		
		Получение белковых препаратов первой субъединицы гемагглютинина вируса гриппа..... 105

5-бөлім
Адам және жануарлар
физиологиясы

Section 5
Human and animal
physiology

Раздел 5
Физиология
человека и животных

Деева О.А., Ледеяева С.С., Кадырбаева Д.С., Сраилова Г.Т.

Исследование гормонального статуса гипофизарно-гонадной системы у девочек-подростков с нарушениями репродуктивной функции..... 114

6-бөлім
Зоология

Section 6
Zoology

Раздел 6
Зоология

Есенбекова П.А., Байжүніс М.Ж., Анарбекова Г.Д.

Дендробионтные полужесткокрылые (Heteroptera) Чарынского Государственного Национального природного парка (Юго-Восточный Казахстан)..... 126