

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

**Журнал Сибирского
федерального университета
Биология**

**Journal of Siberian
Federal University
Biology**

2023 16 (1)

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

2023 16(1)

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

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

Журнал Сибирского федерального университета Биология

Journal of Siberian
Federal University
Biology

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

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

Главный редактор: Е.С.Кравчук. Редактор А.В. Прохоренко.
Корректор Т.Е. Бастрыгина. Компьютерная верстка Е.В. Гревцовой

№ 1. 30.03.2023. Индекс: 42325. Тираж: 1000 экз.

Свободная цена

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

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

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

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

Подписано в печать 24.03.2023. Формат 84x108/16. Усл. печ. л. 9,75.
Уч.-изд. л. 9,25. Бумага тип. Печать офсетная. Тираж 1000 экз. Заказ № 18567.
Возрастная маркировка в соответствии с Федеральным законом № 436-ФЗ: 16+

CHIEF EDITOR

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

SCIENCE EDITOR

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

EDITORIAL BOARD

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

CONTENTS

Olesya V. Kolmakova

Environmental DNA (eDNA) in Fish Biodiversity Studies 5

Olga Yu. Vasilyeva, Sultan Kh. Vyshegurov,

Margarita V. Kozlova, Alexander V. Agafonov and Olga V. Dorogina

Certification of Samples in the Bioresource Collection USU 44053 CSBG SB RAS

Using Digital Seed Library and Cytological and Genetic Methods 24

Olesya E. Zotova and Oxana A. Goncharova

Aspects of *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid Development

on the Introduction above the Arctic Circle 41

Anastasia V. Yakunina and Yulia V. Sinitcina

The Effects of Different Concentrations of Salicylic and Succinic Acids on the Germination

and Morphometric Parameters of Oat *Avena sativa* L. and Wheat *Triticum durum* L. 54

Natalia G. Menzyanova, Svetlana A. Pyatina,

Alexander V. Shabanov and Ekaterina I. Shishatskaya

Dose-Dependent Effects of Nanoscale Forms of Humic Acids

in a Hydroponic Culture of *Triticum aestivum*:

Induction of Oxidative Stress and an Increase in the Number of Border Cells 64

Yuliya D. Anishchenko, Olesya V. Anishchenko,

Ivan V. Zuev, Elena A. Ivanova and Anzhelika A. Kolmakova

Assessment of Anthropogenic Impact on the Yenisei River Anabanch

within the City of Krasnoyarsk Based on Elemental Analysis of Macrophytes and Water 87

Vladimir S. Sibirtsev, Uliana Yu. Nechiporenko,

Vladimir L. Kabanov, Mikhail Yu. Kukin and Mikhail A. Radin

The Procedure of Electrochemical Microbiological Assay

for Comparative Analysis of the Properties of Various Plant Extracts 109

СОДЕРЖАНИЕ

О. В. Колмакова

Экосистемная ДНК (эДНК) в исследованиях биоразнообразия рыб..... 5

О. Ю. Васильева, С. Х. Вышегуров,

М. В. Козлова, А. В. Агафонов, О. В. Дорогина

Паспортизация объектов биоресурсной коллекции USU 44053 ЦСБС СО РАН

с использованием цифровой семенотеки и цитолого-генетических методов..... 24

О. Е. Зотова, О. А. Гончарова

Особенности развития *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid.

при интродукции за Полярным кругом..... 41

А. В. Якунина, Ю. В. Синицына

Влияние салициловой и янтарной кислот разных концентраций на всхожесть

и морфометрические показатели растений овса посевного *Avena sativa* L.

и пшеницы твёрдой *Triticum durum* L. 54

Н. Г. Мензянова, С. А. Пятиня,

А. В. Шабанов, Е. И. Шишацкая

Дозозависимые эффекты наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре

Triticum aestivum: индукция окислительного стресса

и увеличение численности пограничных клеток..... 64

Ю. Д. Анищенко, О. В. Анищенко,

И. В. Зуев, Е. А. Иванова, А. А. Колмакова

Оценка антропогенного воздействия на экосистему р. Енисей в черте г. Красноярска

на основе элементного анализа макрофитов и воды 87

В. С. Сибирцев, У. Ю. Нечипоренко,

В. Л. Кабанов, М. Ю. Кукин, М. А. Радин

Методика электрохимического микробиологического тестирования

в применении к сравнительному анализу свойств различных растительных экстрактов 109

DOI 10.17516/1997-1389-0398

EDN: PQVEDZ

УДК 597.4/5:577.213.3

Environmental DNA (eDNA) in Fish Biodiversity Studies

Olesya V. Kolmakova*

*Institute of Biophysics SB RAS,
Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 08.09.2022, received in revised form 28.09.2022, accepted 14.10.2022, published online 07.11.2022

Abstract. In the last decade, identification of organisms by trace DNA (eDNA) shed into the environment has gained popularity. The main eDNA applications include monitoring of invasive species, conservation of rare species, and assessment of community status. In many countries, environmental practitioners and legislators have already incorporated the eDNA-based methods into routine monitoring schemes, including human impact assessment. In this review, we discuss the methodology, prospects and challenges associated with the use of eDNA for assessing biodiversity of fish communities.

Keywords: environmental DNA, fish, biodiversity, metabarcoding.

Acknowledgements. This study was supported by Federal Tasks for Institute of Biophysics SB RAS No. 0287-2021-0019.

Citation: Kolmakova O. V. Environmental DNA (eDNA) in fish biodiversity studies. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2023, 16(1), 5–23. DOI: 10.17516/1997-1389-0398



Экосистемная ДНК (эДНК) в исследованиях биоразнообразия рыб

О. В. Колмакова

Институт биофизики СО РАН
Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. В последнее десятилетие набирает популярность идентификация организмов по ДНК, оставляемой ими в окружающей среде – эДНК. К основным областям применения эДНК относят мониторинг видов-вселенцев, сохранение редких видов, оценку состояния сообществ. Во многих странах специалисты-практики и законодатели в области охраны окружающей среды уже включили методы, основанные на эДНК, в рутинные схемы мониторинга, в том числе в комплекс мер оценки антропогенного воздействия на окружающую среду. В этом обзоре мы обсудим методологию, перспективы и проблемы, связанные с применением эДНК для оценки биоразнообразия рыбных сообществ.

Ключевые слова: экосистемная ДНК, аквадНК, ДНК окружающей среды, рыбы, биоразнообразие, метабаркодинг.

Благодарности. Работа выполнена по теме Госзадания ИБФ СО РАН № 0287-2021-0019.

Цитирование: Колмакова, О. В. Экосистемная ДНК (эДНК) в исследованиях биоразнообразия рыб / О. В. Колмакова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 5–23. DOI: 10.17516/1997-1389-0398

Введение

Изучение биоразнообразия имеет важнейшее значение для понимания принципов функционирования экосистем и охраны окружающей среды (Duffy et al., 2007; Hillebrand, Matthiessen, 2009). Вместе с тем на практике изучение биоразнообразия может быть весьма сложной задачей. Важным объектом изучения являются рыбы как терминалные консументы в трофических цепях и как объекты промысла (Helfman, 2007). Традиционно при исследовании биоразнообразия рыб используются различные стандартизованные инструменты для отлова и учёта. Сочетание нескольких типов снастей, таких как ставные (жаберные) сети, неводы и тралы, а также электролов (запрещенный

в Российской Федерации) позволяет отловить рыб разных размерных групп и населяющих различные места обитания (Gehri et al., 2021). Однако даже при сочетании нескольких методов отлова многие виды могут оставаться не обнаруженными, и учтённая выборка практически никогда полностью не отражает истинный состав сообщества. Существуют также дополнительные проблемы традиционного отбора проб: неправильная идентификация видов в полевых условиях, высокая стоимость организации и проведения работ, значительные требования к инфраструктуре и рабочей силе, потенциальное разрушение среды обитания при отлове, стресс и гибель рыб и других гидробионтов, а также невозможность обнаружить редкие или

«неуловимые» виды (Gehri et al., 2021; Czachur et al., 2022). Зачастую именно редко встречающиеся виды представляют особый интерес для контролирующих организаций, например, находящиеся под угрозой исчезновения или, напротив, виды-вселенцы на начальной стадии распространения в новые места обитания. Следовательно, ложноотрицательные результаты могут привести к ошибочным интерпретациям и нерациональным решениям в сфере охраны и рационального использования водных биоресурсов.

На рубеже XX и XXI веков молекулярно-генетические методы прочно вошли в арсенал исследователей окружающей среды и даже с переменным успехом вытесняют традиционные методы экологических исследований. Сначала, благодаря методам секвенирования ДНК, стало возможно заглянуть в богатый мир некультивируемых микроорганизмов и открыть тысячи новых видов – прорыв сравнимый с изобретением микроскопа (Shokralla et al., 2012). Затем те же методы приняли на вооружение исследователи более крупных, но порой трудноуловимых представителей флоры и фауны (Thomsen, Willerslev, 2015). Многоклеточные организмы оставляют в окружающей среде свою ДНК, благодаря чему об их присутствии можно узнать даже тогда, когда их уже и «след простыл». Организмы выделяют ДНК в окружающую среду вместе с отслоившимися тканями, гаметами и отходами жизнедеятельности (Gehri et al., 2021). Выделяться может свободная внеклеточная ДНК, но чаще это ДНК в клетках и их фрагментах (Saito, Doi, 2021), называемая в англоязычной литературе environmental DNA (eDNA), в смысловом переводе на русский язык «экосистемная ДНК» (эДНК), или «ДНК окружающей среды» (Кирильчик и др., 2018). Таким образом, эДНК – это генетический материал, собранный непосредственно

из проб окружающей среды без предварительного отлова отдельных организмов (Taberlet et al., 2018). В последние несколько лет исследователи стали принимать во внимание эРНК, которая также является источником информации о присутствии видов в окружающей среде (Yates et al., 2021).

В качестве пробы обычно берут образец воды из природного водоёма, поскольку в ней содержится эДНК как гидробионтов, так зачастую и наземных обитателей водосборного бассейна. Поэтому другое название, предложенное российскими учёными, – «аквадНК» (Никифоров и др., 2018). Не только вода, но и донные отложения, почва и поверхность растений могут служить местами находок эДНК, а в последнее время стало известно о возможности идентифицировать организмы по эДНК из воздуха (Clare et al., 2022; Johnson et al., 2021). И всё же большинство публикаций касается водной среды, и наиболее часто исследуемый объект – это рыбы ввиду их исключительной промыслового-хозяйственной важности. Данный обзор посвящён текущему состоянию дел в области исследований биоразнообразия рыб с помощью эДНК.

Ключевые этапы рабочего процесса

В исследованиях биоразнообразия метод эДНК используется в сочетании с метабаркодингом – параллельной амплификацией ДНК множества организмов из смешанной пробы с использованием универсальных праймеров и последующим высокопроизводительным секвенированием. С момента начала внедрения технологии около десяти лет назад опубликованы сотни исследований с применением самых различных методов отбора проб, выделения ДНК, амплификации маркерных участков, секвенирования и последующей обработки данных (Shu et al., 2020; Wang et al., 2021). В последнее время предпринима-

ются шаги для унификации методик, например инициативы по созданию eDNA Society [<https://ednasociety.org/en/>] в Японии с опубликованной методикой (The eDNA Society, 2019), европейское объединение исследователей COST Action DNAqua-Net [<https://dnaqua.net>] с собственным практическим руководством. В данном разделе мы проведём краткий обзор широко применяемых методик, особое внимание уделив наиболее критичным этапам, на которых нужно выбрать оптимальный подход среди нескольких применимых методов. Также мы обсудим последние тренды стандартизации мониторинга рыбных сообществ с помощью эДНК.

Отбор проб

Самым первым и наиболее важным этапом любого исследования природных экосистем является грамотно спланированный и качественно проведённый пробоотбор. На этапе подготовки необходимо определить место и время пробоотбора в зависимости от поставленных целей. Концентрация эДНК в воде зависит от сезона, причём в умеренной зоне общая схема выглядит так: минимальная концентрация зимой и максимальная в период нереста (Hayami et al., 2020). Необходимо учитывать такие факторы, как сезонная стратификация озёр, гидрологический режим, миграция рыб и даже «цветение» воды фитопланктоном, которое может ингибировать амплификацию ДНК (Bruce et al., 2021; Littlefair et al., 2021). Выбор станций для пробоотбора зависит от типа и морфологии водоёма, в особенности от расположения естественных препятствий для миграции эДНК, а также потенциальных источников контаминации: сточных вод, мест рыбной ловли и других видов человеческой деятельности (Hargre et al., 2019; The eDNA Society, 2019). При отборе проб следует избегать взмучивания донных отложений,

так как эДНК в них может сохраняться гораздо дольше, чем в воде (Wood et al., 2020).

Объём и число проб могут серьёзно влиять на результат оценки биоразнообразия рыб. Тем не менее чётко определённого универсального значения этих показателей нет и быть не может. Необходимый объём проб зависит от типа водоёма: например, в чистых олиготрофных водах, таких как открытое море, концентрация эДНК ниже, поэтому нужны пробы большего объёма, чем в заливах (Kumar et al., 2022). Бессей с соавторами (Bessey et al., 2020) советуют отбирать настолько большой объём воды, насколько это возможно (вплоть до десятков литров). В то же время для континентальных вод объём 1–2 литра считается достаточным. Минимально необходимое число проб зависит от цели исследования, типа и размера водоёма, наличия разных местообитаний в пределах одного водоёма (Bruce et al., 2021). Для морских экосистем (Czachur et al., 2022) рекомендуют брать пробы в трёх повторностях на как можно большем количестве станций. Так, Бессей с соавторами (Bessey et al., 2020) сообщают, что равные по объёму аликовоты проб из одного и того же объёма морской воды содержат менее 60 % общих видов. Авторы рекомендуют предоставлять кривую аккумуляции видов, чтобы подтвердить эффективность исследования. Максимальное число проб ограничивается только финансовыми и временными возможностями исследователей. Отчёт британской Службы окружающей среды (Environment Agency) свидетельствует, что 10–20 станций пробоотбора достаточно для описания разнообразия видов в озере большого размера (Hänfling et al., 2016a).

Концентрирование эДНК

Сразу после отбора пробы или при первой возможности необходимо концентриро-

вать эДНК из объема воды во избежание деградации генетического материала (Goldberg et al., 2016). Наиболее часто для этого используется фильтрация, реже спиртовое осаждение. Материал мембранны (нитрат целлюлозы, полизэфирсульфан, поливинилиденфторид, поликарбонат или стекловолокно) и размер пор (существенно различается, но обычно менее 1 мкм) ограничивают объем воды, который может быть пропущен через один фильтр (Goldberg et al., 2016). Сравнение разных типов фильтров показало преимущество стекловолоконных мембранны над поликарбонатными (Eichmiller et al., 2016). Есть предложения использовать положительно заряженные фильтры для более эффективного удержания эДНК на поверхности фильтра (Zaiko et al., 2022).

Максимальный размер пор фильтра ограничивается тем, что при слишком большом размере пор клетки и другие ДНК-содержащие частицы могут проходить через фильтр вместе с фильтратом. Размер большинства частиц, содержащих эДНК рыб, составляет 1–10 мкм, поэтому теоретически потеря эДНК должна быть минимальной при размерах пор до 1 мкм (Bruce et al., 2021). Кумар с соавторами (Kumar et al., 2022) обнаружили, что фильтры с порами любого размера в пределах 0,2–3 мкм улавливают схожие концентрации эДНК и, соответственно, дают схожие оценки разнообразия рыб, однако поры меньшего размера могут забиваться быстрее, что важно учитывать при отборе проб воды с большим количеством взвешенного вещества. Аналогично в исследовании Зайко с соавторами (Zaiko et al., 2022) фильтры с большим размером пор (5 мкм) позволяли проводить фильтрацию больших объемов воды быстрее по сравнению с порами меньшего размера, при этом сохранялась эффективность концентрирования эДНК и эРНК. Быстрая фильтрация

позволяет сократить деградацию генетического материала, что особенно важно в случае эРНК. Во избежание контаминации рекомендуется использование закрытого картриджа вместо мембранных фильтров (Wong et al., 2020), однако выбор размеров фильтров и типов мембранны в этом случае ограничен. После фильтрации фильтр замораживают, сушат или консервируют и хранят до выделения ДНК (Mauvisseau et al., 2021). Длительное хранение фильтров не рекомендуется, так как уменьшается концентрация выделенной ДНК (Kumar et al., 2022).

Выделение ДНК

Для выделения ДНК чаще всего используются коммерческие наборы и гораздо реже методы разделения жидких фаз: с применением фенол-хлороформа или цетилтри-метиламмоний бромида (Wang et al., 2021). Эффективность методов сильно различается как по концентрации выделенной ДНК, так и по степени чистоты экстракта. Оптимальное соотношение цена/выход ДНК у фенол-хлороформного метода экстракции (Goldberg et al., 2016), но некоторые исследователи отмечают недостаточную очистку от ингибиторов ПЦР при его использовании (Kumar et al., 2022). Тем не менее вне зависимости от разной эффективности методов выделения ДНК итоговый результат оценки разнообразия может оказаться схожим.

Подготовка библиотек для секвенирования

При создании метабаркодинговых библиотек для секвенирования происходит три основных процесса: ПЦР-амплификация баркодингового участка; присоединение к ампликонам уникальных для каждой пробы индексов, состоящих из нескольких нуклеотидов (это позволяет наносить множество об-

разцов на одну проточную ячейку – уникальный индекс поможет различить пробы при последующей биоинформационической обработке); пришивка адапторов для последующего прикрепления ампликона к проточной ячейке для секвенирования. Ключевым на этом этапе является выбор молекулярного маркера и олигонуклеотидных праймеров для его амплификации.

Для метабаркодинговых исследований применяются самые разные молекулярные маркеры, в основном участки mtДНК (COI, cytb, 12S pPHK, D-петля), которые подходят для разных таксонов и методов исследования (Wang et al., 2021). С другой стороны, высказываются мнения в поддержку использования маркеров ядерной ДНК, так как она менее подвержена количественным вариациям в зависимости от возраста и стадии развития организма (Jo et al., 2020). Оптимальный маркер обладает достаточным количеством вариабельных сайтов для различения видов, но в то же время содержит консервативные участки для отжига прямого и обратного праймеров. Исследователи и пользователи, применяющие в своей практике эДНК, признают, что требуется стандартизация метода (Zhang et al., 2020; Wang et al., 2021). В частности, в Японии создано Общество эДНК (eDNA Society, <https://ednasociety.org/en/>), целью которого является продвижение и стандартизация метода для устойчивого природопользования и охраны окружающей среды. Им рекомендуется для метабаркодинговых исследований разнообразия рыб использовать праймеры MiFish-U (Miya et al., 2015), предназначенные для амплификации участка 12S pPHK длиной примерно 170 пар нуклеотидов. MiFish-U является одной из наиболее часто и успешно применяемых пар праймеров, однако и она не является оптимальной для всех таксонов. В идеале маркер должен обладать

высокой специфичностью ко всем рыбам исследуемой группы, пропорционально амплифицироваться у разных видов и иметь высокую разрешающую способность (Zhang et al., 2020). Длина маркера также имеет значение: чем длиннее фрагмент, тем больше вариабельных сайтов и лучше таксономическая идентификация. Однако, с другой стороны, короткие баркоды успешной амплифицируются и медленнее деградируют в окружающей среде (Jo et al., 2017). Длина фрагмента также ограничена возможностями технологии секвенирования. Например, у наиболее часто применяемой Illumina MiSeq это около 450 пар нуклеотидов (Bruce et al., 2021). Наконец, наличие хороших баз данных маркерных последовательностей также играет важную роль для успеха баркодинга. Все эти требования могут быть недостижимы, если использовать только одну пару праймеров. Некоторые авторы по этой причине предлагают использовать сочетание двух или более праймеров с разными свойствами (Polanco et al., 2021).

В работе (Shu et al., 2020) была оценена эффективность 18 часто применяемых пар праймеров *in silico* путем выбора наиболее оптимальных по сочетанию следующих параметров: количество охватываемых видов, длина маркера, разрешающая способность и специфичность амплификации. На втором этапе исследователи сравнили 4 пары наиболее перспективных праймеров между собой в контролируемом эксперименте с 6 видами рыб в разных пропорциях. MiFish-U и 2 пары 16S pPHK праймеров показали наилучший результат, в том числе значимую положительную зависимость между числом прочтений секвенирования и биомассой видов. В другом исследовании (Zhang et al., 2020) были протестированы 22 пары праймеров *in silico*, а затем в метабаркодинговом исследовании *in situ*. 12S pPHK праймеры, в том числе

MiFish-U, превосходили все другие по детекции разнообразия рыб (числу амплифицированных видов). Альтернатива выбору одного маркерного участка была предложена Дейнер с соавторами (Deiner et al., 2017), которые рекомендовали митогеномный метабаркодинг рыб с помощью пары праймеров, позволяющей амплифицировать всю молекулу mtДНК. Впоследствии продукт амплификации был фрагментирован и отсеквенирован по стандартному протоколу. Преимуществом такого метода является высокое разрешение при идентификации видов.

Секвенирование

В подавляющем большинстве метабаркодинговых исследований используется технология секвенирования путём синтеза, осуществляемого на оборудовании производителя Illumina, поскольку она зарекомендовала себя наилучшим соотношением цены и качества (Bruce et al., 2021). В последнее время всё популярнее становится технология нанопорового секвенирования Oxford Nanopore на компактном приборе MinION по причине доступной цены оборудования, портативности и большой длины прочтения, что может быть значительным преимуществом в случае секвенирования длинных последовательностей или целого митогенома (Franco-Sierra, Díaz-Nieto, 2020). С другой стороны, технология нанопорового секвенирования характеризуется большим процентом ошибок и более высокой стоимостью секвенирования в пересчете на число нуклеотидов.

Биоинформационический анализ

По окончании секвенирования полученные сырье прочтения нуклеотидных последовательностей подвергают биоинформационической обработке. Для этого используются биоинформационические конвейеры, как

изначально разработанные для микробиологических исследований, например QIIME 2 (Bolyen et al., 2019) и dada2 (Callahan et al., 2016), так и специализированные на метабаркодинге эДНК, такие как baqve и OBITools (Mathon et al., 2021). Разработаны приложения для пользователей, не обладающих биоинформационическими навыками, например SLIM (Dufresne et al., 2019). SLIM имеет пользовательский интерфейс и позволяет пользоваться алгоритмами dada2, vsearch и др. Относительно мало информации доступно о том, какая программа лучше подходит для решения тех или иных задач. Маче с соавторами (Macé et al., 2022) сравнили несколько конвейерных программ для оценки внутривидового разнообразия по данным секвенирования эДНК и пришли к выводу, что dada2 является наилучшей.

Общий принцип биоинформационической обработки «сырых» нуклеотидных прочтений сводится к следующим этапам (в зависимости от используемого алгоритма этапы могут проходить в разном порядке):

демультиплексирование последовательностей, то есть разделение всего пула прочтений на отдельные образцы, благодаря уникальным индексам;

удаление последовательностей праймеров, адаптеров и индексов;

фильтрация по качеству и длине прочтений;

распределение прочтений на группы близких ОТЕ (операционные таксономические единицы, в англоязычном варианте – operation taxonomic units, OTU) или идентичных последовательностей ВПА (варианты последовательности ампликонов, amplicon sequence variants – ASV);

удаление химерных последовательностей, которые спонтанно образуются из разных молекул ДНК в ходе амплификации;

создание таблицы ОТЕ или ВПА, отражающей число каждого вида последовательности в соответствующем образце;

таксономическая аннотация последовательностей на основе информации в специализированных базах данных.

Заметным препятствием на пути применения метода эДНК является неполнота баз данных, применяемых для таксономической аннотации рыб. Дело в том, что в баркодинговых исследованиях отдельных организмов в качестве «золотого стандарта» применялся участок митохондриального гена COI. Сдвиг основного маркера с COI на 12S рРНК потребовал дополнения информации об этих последовательностях в существующих базах данных, таких как Genbank, или создание новых, специализированных на метабаркодинге рыб. Перспективной в этом отношении является база митохондриальных геномов рыб MitoFish (Sato et al., 2018).

Оценка биомассы и численности рыб на основе данных метабаркодинга эДНК

Можно ли с помощью эДНК определить не только наличие/отсутствие видов рыб, но и дать количественную оценку их разнообразия? В первую очередь исследователей интересует численность и биомасса. Сочетание высокопроизводительного секвенирования с количественной ПЦР (кПЦР) позволяет провести приблизительную оценку численности и биомассы отдельных видов рыб. Метаанализ, выполненный Ятес с соавторами (Yates et al., 2019), подтвердил, что концентрация видоспецифичной эДНК положительно коррелирует с биомассой в лабораторных исследованиях (82 % наблюдаемой вариации), но в меньшей степени в полевых исследований (57 % наблюдаемой вариации). Ушио с соавторами (Ushio et al., 2018) показали возможность количественной оценки копий эДНК

рыб с помощью использования внутренних стандартных ДНК, добавленных к образцам природной эДНК. В качестве стандартов использовались известные количества коротких фрагментов ДНК видов рыб, которые никогда не наблюдались в районе отбора проб. Расчётное число копий внутренних стандартов показало значительную положительную корреляцию с числами, определенными с помощью кПЦР, что позволяет предположить, что метабаркодинг с добавлением стандартной ДНК обеспечивает достоверную количественную оценку эДНК. Кроме того, для образцов, в которых наблюдается высокий уровень ингибирования ПЦР, этот метод может обеспечить более точную количественную оценку, чем кПЦР, потому что поправочные уравнения, созданные с использованием внутренних стандартных ДНК, будут учитывать эффект ингибирования ПЦР.

Количественная оценка разнообразия видов зависит от концентрации их эДНК во время отбора проб, которая определяется взаимодействием между процессами выделения, транспорта, ресуспенсирования и распада эДНК в водоёме (Shogren et al., 2019; Trujillo-González et al., 2021). Также большую роль играют ошибки, случающиеся при отборе и обработке проб и интерпретации результатов. Например, амплификация маркерных участков значительно искажает изначальное соотношение эДНК разных видов в пробе, и хотя разработаны методы, позволяющие обходиться без ПЦР (shotgun секвенирование и целевой захват ДНК), используются они редко по причине высокой стоимости (Wang et al., 2021). В любом случае количественные результаты, выражаемые в виде числа прочтений каждого вида/гаплотипа/ОТЕ, нельзя напрямую соотносить с числом особей соответствующего вида, поскольку на итоговое число прочтений влияет большое количество

факторов. Тем не менее при грамотном использовании и интерпретации данные секвенирования дают примерное представление об относительной численности рыб. В этом разделе мы обсудим ключевые параметры, определяющие концентрацию эДНК, и ограничения этого метода для оценки биоразнообразия рыб.

Скорость выделения эДНК в окружающую среду

Скорость выделения эДНК в окружающую среду сильно варьирует в зависимости от многих факторов: вида рыбы, физиологического состояния (стресс/покой), уровня метаболизма (температура, жизненная стадия, сезонная активность, размер тела) (Rourke et al., 2022). Только что выловленные рыбы, помещённые в аквариум, выделяют больше эДНК, так как они более подвижны и находятся в стрессовом состоянии (Maruyama et al., 2014). Чем меньше и моложе животное, тем выше уровень метаболизма и больше ДНК на единицу массы тела оно выделяет. Поскольку уровень метаболизма рыб зависит от температуры окружающей среды и от количества и качества потребляемой пищи, это также сказывается на скорости выделения ДНК. Выделение ДНК значительно усиливается во время нереста, особенно в результате выделения половых продуктов в среду и возрастающей активности (Bruce et al., 2021). Более того, нельзя не учитывать неравномерность экскреции ДНК во времени: в некоторых экспериментах было показано, что в разные дни одна и та же рыба может выделять эДНК в количествах, различающихся на два порядка.

Неравномерность распределения эДНК

Рыбы распределены в водной среде неравномерно, часто собираются в косяки

и стайки, а также могут предпочитать одни участки водоёма другим или обитать на определённой глубине, в результате чего эДНК также имеет неравномерное распределение в пространстве (Rourke et al., 2022). Так, Хаями с соавторами (Hayami et al., 2020) обнаружили больше видов рыб на отмели, чем в центре водохранилища.

Движение водных масс также влияет на распределение эДНК в водоёме, особенно усложняется распределение ДНК в реках и других водоёмах с высокой скоростью течения, а также в приливно-отливной зоне. В некоторых исследованиях пик концентрации эДНК в реке наблюдался в 50–70 метрах ниже по течению от места нахождения косяка рыбы, тогда как в других работах обнаружено, что эДНК не детектируется на некотором удалении от её источника (Bruce et al., 2021). Большое влияние на скорость перемещения эДНК может иметь адсорбция эДНК на разных типах донных субстратов, где она может удерживаться и потом снова смыться водными массами (Fremier et al., 2019). В некоторых случаях за счет адсорбции на донном субстрате из воды исчезает больше эДНК, чем за счет деградации (Shogren et al., 2019).

Скорость деградации ДНК

От скорости деградации эДНК зависит, в течение какого времени возможна детекция видов (Holman et al., 2022). С одной стороны, благодаря тому, что эДНК разрушается, по её наличию можно судить об актуальном статусе вида в данной точке. С другой стороны, в некоторых случаях быстрая деградация препятствует детекции вида, населяющего водоём. Деградация происходит в основном в результате деятельности микроорганизмов и активности внеклеточных ферментов (Saito, Doi, 2021). Обнаружено, что деградация не всегда происходит с по-

стоянной скоростью, а скорее «скачкообразно», что может быть связано с изначальным разрушением клеток и освобождением ДНК, затем деградацией самой ДНК микроорганизмами. Основными факторами, влияющими на скорость деградации эДНК, являются в первую очередь температура и в меньшей степени солнечный свет (ультрафиолет) и химический состав воды (Holman et al., 2022). Щелочная среда, постоянная температура, высокая соленость и концентрация ионов уменьшают скорость деградации эДНК (Collins et al., 2018). Так, скорость деградации эДНК карпа значительно отличалась в дистрофических, эвтрофических и олиготрофических озёрах, что объясняется связыванием эДНК с растворённым органическим веществом, препятствующим ферментативной деградации (Eichmiller et al., 2016). Имеет значение даже вид организмов и расположение маркерного участка – в ядерной, митохондриальной или рибосомной ДНК, так как органеллы деградируют с разной скоростью (Collins et al., 2018). Обычно полная деградация эДНК происходит примерно за 2–7 дней, однако может быть и от нескольких часов до тысячелетий (Holman et al., 2022; Saito, Doi, 2021). Также стоит учитывать, что чем длиннее маркерный фрагмент, тем быстрее он будет деградировать, поэтому длинные фрагменты более точно свидетельствуют о текущей численности организмов (Jo et al., 2017), в то время как короткие фрагменты эДНК могут быть детектированы долгое время после перемещения или смерти организмов, что является примером ложноположительного результата.

Чтобы избежать ложноположительных результатов из-за длительной стабильности эДНК после перемещения или гибели организма, предлагается дополнительно одновременно исследовать эРНК (РНК окружающей

среды) (Pochon et al., 2017). эРНК считается менее устойчивой в окружающей среде молекулой, однако есть случаи обнаружения эРНК спустя несколько часов после изъятия организма из водной среды (Wood et al., 2020). В любом случае соотношение концентраций эРНК/эДНК в воде уменьшается с течением времени при деградации, что может помочь определить возраст геномного материала (Marshall et al., 2021).

Контаминация

и ложноположительные результаты

Ложные положительные результаты могут быть также вызваны кросс-контаминацией, которая может случиться на любом этапе работы, как при отборе проб, так и в ходе лабораторного анализа (Thomsen, Willerslev, 2015). Во избежание этого работы должны проводиться квалифицированным персоналом, обработка проб должна осуществляться в оборудованной по всем правилам лаборатории (положительное давление, сменная одежда операторов, правильная организация рабочего процесса с разделением зон на пре-ПЦР, ПЦР и пост-ПЦР) (Darling et al., 2021). Для контроля контаминации на основных этапах к набору проб добавляют отрицательный контроль (Goldberg et al., 2016). Также отдельное внимание необходимо уделять аккуратности таксономической идентификации видов: правильному выбору праймеров, автоматической аннотации на основании последовательностей ДНК, потенциальной гибридизации видов (Darling et al., 2021; Gehri et al., 2021).

Ингибирование

и ложноотрицательные результаты

Ещё одним типом ошибки анализа биоразнообразия на основе эДНК являются ложноотрицательные результаты. Так, содержа-

щиеся в природной воде гуминовые вещества могут ингибировать ПЦР, приводя к ложноотрицательным результатам (Thomsen, Willerslev, 2015). Детектировать ингибирование помогает добавление внутреннего положительного контроля, представляющего собой ДНК целевых организмов, непосредственно в образец выделенной эДНК перед амплификацией (Goldberg et al., 2016). Бороться с ингибиторами помогает разбавление образцов, тщательная очистка образцов ДНК или добавление белков, таких как бычий сывороточный альбумин (Nagreg et al., 2019). В некоторых случаях эДНК не детектируется из-за низкой концентрации. В таких случаях параллельное выделение эРНК может помочь детекции благодаря относительно высокой концентрации рРНК (Marshall et al., 2021).

Сравнение эДНК со стандартными методами оценки биоразнообразия рыб

Результаты учёта биоразнообразия рыб, полученные с помощью метабаркодинга эДНК, сравнимы или даже превосходят по эффективности традиционные методы учёта с помощью орудий лова или подводной видеодокументации (Gehri et al., 2021; Hallam et al., 2021; Wang et al., 2021). Основным преимуществом эДНК является неинвазивность технологии, так как не применяется лов самих рыб, и вмешательство в их местообитание является минимальным. Кроме того, традиционные методы трудоёмкие, требуют специального разрешения, а морфологическая идентификация может привести к ошибкам, поэтому требует навыков профессионального ихтиолога (Czachur et al., 2022; Kumar et al., 2022). Снижение затрат при использовании эДНК позволит проводить исследования чаще, охватывать большие территории. Бонусом эДНК также является «побочный» улов

при условии применения универсальных или дополнительных праймеров: поскольку пул метагеномной эДНК содержит молекулы всех обитателей водоёма, то помимо рыб можно идентифицировать амфибий, водных беспозвоночных, простейших, планктон и даже наземных животных с прилегающих к водоёму территорий (Nguyen et al., 2020; Macher et al., 2021).

Рыбы часто распределены в пространстве неравномерно: собираются в косяки, предпочитают держаться в определённых местах обитания, прячутся от хищников. По этой причине многие виды рыб могут быть не обнаружены стандартными методами, если орудие лова не было расположено в точке наибольшего скопления рыб. В то же время они могут быть обнаружены с помощью пробы эДНК, взятой на расстоянии десятков или сотен метров от места расположения рыб. Молекулы эДНК перемешиваются в толще воды при движении водных масс, поэтому эДНК распределена в водной среде более равномерно, чем сами рыбы. В этом преимущество использования метода эДНК для оценки наличия/отсутствия видов. С другой стороны, по причине «мобильности» использование эДНК может давать ложноположительный результат. Например, эДНК может переноситься на далёкие расстояния с фекалиями хищников, а также при перемещении мёртвых рыб хищниками или падальщиками (Goldberg et al., 2016), то есть эДНК долгое время остаётся детектируемой после смерти организма (Gehri et al., 2021). По этой причине рекомендуется дополнять эДНК одновременным исследованием эРНК. Разные скорости выделения и деградации эДНК и эРНК могут привести к более точным результатам оценки биоразнообразия, чем при использовании только одной технологии. Комбинация эДНК/эРНК может помочь в сложных для интерпре-

тации случаях и дать более точные данные (Marshall et al., 2021). Первое исследование, применившее оба метода одновременно для изучения биоразнообразия рыб, показало, что чувствительность эРНК была эквивалентна чувствительности эДНК; однако его прогностическая значимость положительного результата была выше, чем у эДНК (Miyata et al., 2021). Кроме того, исследование эРНК позволило выявить случаи ложноположительного обнаружения видов по эДНК в результате загрязнения водоёма сточными водами с содержанием отходов рыбопродуктов.

Несмотря на большое преимущество применения эДНК, важная информация может быть упущена или искажена, если не дополнять метабаркодинг эДНК традиционными методами. Например, данные о половой, возрастной и размерной структуре популяций, а также о межвидовой гибридизации не могут быть получены при использовании метабаркодинга эДНК (Goldberg et al., 2016; Gehri et al., 2021). Кроме того, как мы уже обсуждали выше, даже в контролируемых условиях эксперимента часто не удается обнаружить зависимость количества прочтений эДНК от количества особей или их биомассы (Shu et al., 2020). С осторожностью следует полагаться на данные эДНК при мониторингах биоразнообразия с целью охраны окружающей среды. В то время как обнаружение видов-вселенцев с помощью эДНК может дать ранний сигнал об их присутствии (Goldberg et al., 2016), использование исключительно эДНК для мониторинга редких видов может скрыть фактическое сокращение их численности.

Подводя итог сказанному, нельзя ожидать, что метабаркодирование эДНК полностью заменит стандартные методы для оценки популяций рыб. Для тех видов, которые легко обнаружить визуальным учётом, эДНК может быть даже менее эффективным мето-

дом. Однако применение эДНК в комбинации с зарекомендовавшими себя традиционными методами может помочь исследованию, эффективному использованию и охране популяций рыб.

Особенности применения эДНК для оценки биоразнообразия рыб в различных типах водоёмов

Озёра

Озёра являются классическими водоёмами для проведения метабаркодинга эДНК (Hänfling et al., 2016b; Valdez-Moreno et al., 2019; Littlefair et al., 2021). Гидрология озёр позволяет эДНК распространяться в толще воды относительно предсказуемо, что облегчает моделирование динамики популяций на основе данных эДНК. Тем не менее при планировании мест отбора проб необходимо учитывать уникальную морфологию озера и тип стратификации (Littlefair et al., 2021). Оптимальным является взятие нескольких проб вдоль береговой линии, а также в центральной части озера в разных слоях в случае глубоких или стратифицированных озёр (Bruce et al., 2021).

Пруды

Пруды по большей части игнорируются в исследованиях биоразнообразия по причине своей многочисленности и «неуникальности», в то время как они являются отличным местом для сбора проб, поскольку ввиду небольшого объёма часто накапливают высокие концентрации эДНК, а также ввиду большого числа в совокупности могут обладать высоким биоразнообразием (Hargre et al., 2019). К методическим особенностям работы с прудами относится мутность воды с высоким содержанием частиц отмершей высшей растительности и микроводорослей, что приводит к быстрому забиванию фильтров.

Реки

В проточных водоёмах надёжность метода эДНК может казаться сомнительной из-за высокой скорости перемещения носителя. Однако многократные исследования доказали возможность применения эДНК для оценки распределения сообществ рыб в реках. Так, на основе пространственно-временного мониторинга эДНК рыб Ляпорте с соавторами (Laporte et al., 2021) выделили 8 видовых сообществ, распределённых по речной системе с притоками, причём эти сообщества были устойчивыми даже в разные годы. Халлам с соавторами (Hallam et al., 2021) продемонстрировали, что применение метабаркодинга эДНК рыб выявляет больше пресноводных видов в реке Темзе, чем сочетание электролова, бортового траления, лова ручной сетью и береговым неводом, даже несмотря на обширные усилия по отбору проб с помощью традиционных методов. Авторы считают, что некоторая вариабельность в результатах, полученных разными методами, не повлияет на точность простых экологических моделей структуры сообщества и, таким образом, не должна рассматриваться как серьезное препятствие для внедрения эДНК в рутинный мониторинг речных сообществ. Аналогично в небольшом ручье Олдс с соавторами (Olds et al., 2016) с большой достоверностью идентифицировали на 4 вида больше с помощью эДНК, чем с помощью электролова.

Исследователи не могут сойтись во мнении, насколько далеко может путешествовать эДНК от источника вниз по реке. В одних исследованиях концентрация эДНК плавно убывает при удалении от источника, в то время как в других на протяжении 9 км нет заметных трендов в изменении концентрации эДНК (Laporte et al., 2021). Моделирование траектории распространения эДНК кумжи показало, что она переносилась практически

без латерального смещения по прямой линии на протяжении 5 км (Laporte et al., 2020). Предполагается, что лучше всего отражают концентрацию эДНК при удалении от источника гидродинамические модели распространения ДНК, которые зависят от особенностей конкретной речной системы (Laporte et al., 2021), в первую очередь от скорости течения.

При отборе проб в реках рекомендуется отбирать пробы через примерно равные интервалы, но при этом учитывать расположение притоков (Bruce et al., 2021).

Моря

Основной сложностью изучения биоразнообразия морей является высокая логистическая стоимость традиционно применяемых программ мониторинга (Czachur et al., 2022). Данные о распределении морских рыб обычно основаны на информации об уловах, полученных в результате коммерческого рыболовства или экологических исследований, поэтому в основном касаются промысловых видов. В связи с этим данные о биоразнообразии морских рыб ограничены как во времени, так и в пространстве.

Метабаркодинг эДНК представляет решение проблем традиционного мониторинга, так как пробы можно брать прямо в прибрежной зоне, не выходя в открытое море (Czachur et al., 2022). Конечно, в этом случае могут быть не зарегистрированы виды, обитающие на больших глубинах или в открытом океане (Bruce et al., 2021). Оптимальной схемой отбора проб в морских системах является взятие большого количества проб равномерно по трансектам и на разных глубинах.

Применение эДНК для мониторинга рыб в России

В последние несколько лет в России появились первые исследования рыб с помо-

шью метабаркодинга эДНК. Первым из отечественных проектов стал стартовавший мониторинг ценных и исчезающих видов рыб Дальнего Востока (Туранов, 2020). Обсуждаются перспективы применения и апробируется метод эДНК для изучения гидробионтов Байкала (Kirilchik, 2018). Также иностранные исследователи выполняют работы в верховьях Волги (Schenekar et al., 2020).

Экономическая эффективность применения метода эДНК в российских условиях неоднозначна. Зарубежные исследования считают метабаркодинг эДНК дешевой альтернативой «научному лову» (Zhang et al., 2020). Спецификой нашей страны является относительно высокая стоимость реактивов для молекулярной генетики и услуг по секвенированию, из-за чего высокопроизводительное секвенирование дороже, чем в США и многих других странах. В то же время стоимость профессиональной рабочей силы относительно низкая. Тем не менее из-за обширной территории и нехватки специалистов-ихтиологов широкомасштабные исследования биоразнообразия, такие как проводятся в Канаде и Японии, возможны только с использованием эДНК и полностью оправданы с точки зрения затрат, поскольку, как никакое другое мероприятие, позволяют принимать рациональные решения для сохранения биоразнообразия в условиях растущего антропогенного пресса на окружающую среду. Для успешного применения эДНК в России понадобится дополнение генетических баз данных рыб отсутствующими последовательностями видов-эндемиков и местных популяций.

Заключение

Неоспоримо, что в будущем эДНК войдёт в арсенал стандартных методов мониторинга водных экосистем, как вошли молекулярно-генетические методы в криминалистику, клиническую диагностику и другие сферы общественной жизни. Во многих странах уже работают коммерческие компании, оказывающие услуги по исследованию биоразнообразия водоёмов и их водосборных бассейнов, в особенности на предмет наличия охраняемых или инвазивных видов (EnviroDNA, Австралия; Naturemetrics, Великобритания; Genidaqs, США; eDNASolutions, Швеция и др.). Государственные органы охраны окружающей среды многих стран и другие природоохранные организации рекомендуют применять эДНК для рутинного мониторинга популяций рыб (Hänfling et al., 2016a; The eDNA Society, 2019; Bruce et al., 2021).

Мониторинг биоразнообразия рыб с помощью эДНК часто превосходит традиционные методы по количеству обнаруженных видов, при этом он менее трудоёмкий и помогает избежать отрицательных последствий для рыб и их мест обитания. С другой стороны, для получения количественной информации о численности и биомассе по эДНК необходимо учитывать биологию вида, а также знать возрастно-размерную структуру популяции (Maruyama et al., 2014; Rourke et al., 2022), а значит – дополнять метабаркодинг эДНК традиционными методами. Будущие исследования должны сосредоточиться на разработке количественных методов мониторинга биоразнообразия рыб по эДНК, а также гибких общепринятых стандартов методики.

Список литературы / References

Кирильчик С.В., Макаров М.М., Аношко П.Н., Астахова М.С., Смолин И.Н., Дзюба Е.В. (2018) Апробация метода количественного анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля. *Международный журнал прикладных*

и фундаментальных исследований, 6: 98–102 [Kirilchik S. V., Makarov M. M., Anoshko P. N., Astakhova M. S., Smolin I. N., Dzyuba E. V. (2018) Testing method quantitative eDNA analysis for stock assessment and monitoring of Baikal omul populations. *International Journal of Applied and Fundamental Research* [Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanii], 6: 98–102 (in Russian)]

Никифоров А. И., Гаврилов Б. А., Круглова Д. К., Посохова Е. С., Рабазанов Н. И., Орлов А. М. (2018) Исследования с использованием выделенной из водной среды ДНК: состояние и перспективы. *Успехи современной биологии*, 138(1): 18–30 [Nikiforov A. I., Gavrilov B. A., Kruglova D. K., Posokhova E. S., Rabazanov N. I., Orlov A. M. (2018) A research using DNA extracted from aquatic environment: state and prospects a research using DNA extracted from aquatic environment: state and prospects. *Advances of Contemporary Biology* [Uspekhi sovremennoy biologii], 138(1): 18–30 (in Russian)]

Туранов С. В. (2020) ДНК из водной среды – сбор и выделение. Электронный ресурс [http://www.smakeev.com/userfiles/science/turanov_s._v._2020._zametka_pro_sbor_i_vydelenie_dnk_iz_vodnoy_sredy.pdf] [Turanov S. V. (2020) DNA from aquatic environment – collection and extraction. Electronic source [http://www.smakeev.com/userfiles/science/turanov_s._v._2020._zametka_pro_sbor_i_vydelenie_dnk_iz_vodnoy_sredy.pdf] (in Russian)]

Bessey C., Jarman S. N., Berry O., Olsen Y. S., Bunce M., Simpson T., Power M., McLaughlin J., Edgar G. J., Keesing J. (2020) Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4): 493–504

Bolyen E., Rideout J. R., Dillon M. R. et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8): 852–857

Bruce K., Blackman R., Bourlat S. J., Hellström A. M., Bakker J., Bista I., Bohmann K., Bouchez A., Brys R., Clark K., Elbrecht V., Fazi S., Fonseca V., Hänfling B., Leese F., Mächler E., Mahon A. R., Meissner K., Panksep K., Pawłowski J., Schmidt Yáñez P., Seymour M., Thalinger B., Valentini A., Woodcock P., Traugott M., Vasselon V., Deiner K. (2021) *A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment*. Sofia, Pensoft Publishers

Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581–583

Clare E. L., Economou C. K., Bennett F. J., Dyer C. E., Adams K., McRobie B., Drinkwater R., Littlefair J. E. (2022) Measuring biodiversity from DNA in the air. *Current Biology*, 32(3): 693–700.e5

Collins R. A., Wangensteen O. S., O’Gorman E. J., Mariani S., Sims D. W., Genner M. J. (2018) Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1(1): 185

Czachur M. V., Seymour M., Creer S., von der Heyden S. (2022) Novel insights into marine fish biodiversity across a pronounced environmental gradient using replicated environmental DNA analyses. *Environmental DNA*, 4(1): 181–190

Darling J. A., Jerde C. L., Sepulveda A. J. (2021) What do you mean by false positive? *Environmental DNA*, 3(5): 879–883

Deiner K., Renshaw M. A., Li Y., Olds B. P., Lodge D. M., Pfrender M. E. (2017) Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(12): 1888–1898

- Duffy J. E., Cardinale B. J., France K. E., McIntyre P. B., Thébault E., Loreau M. (2007) The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecology Letters*, 10(6): 522–538
- Dufresne Y., Lejzerowicz F., Perret-Gentil L. A., Pawlowski J., Cordier T. (2019) SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. *BMC Bioinformatics*, 20(1): 88
- Eichmiller J. J., Miller L. M., Sorensen P. W. (2016) Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 56–68
- Franco-Sierra N. D., Díaz-Nieto J. F. (2020) Rapid mitochondrial genome sequencing based on Oxford Nanopore Sequencing and a proxy for vertebrate species identification. *Ecology and Evolution*, 10(7): 3544–3560
- Fremier A. K., Strickler K. M., Parzych J., Powers S., Goldberg C. S. (2019) Stream transport and retention of environmental DNA pulse releases in relation to hydrogeomorphic scaling factors. *Environmental Science and Technology*, 53(12): 6640–6649
- Gehri R. R., Larson W. A., Gruenthal K., Sard N. M., Shi Y. (2021) eDNA metabarcoding outperforms traditional fisheries sampling and reveals fine-scale heterogeneity in a temperate freshwater lake. *Environmental DNA*, 3(5): 912–929
- Goldberg C. S., Turner C. R., Deiner K., Klymus K. E., Thomsen P. F., Murphy M. A., Spear S. F., McKee A., Oyler-McCance S. J., Cornman R. S., Laramie M. B., Mahon A. R., Lance R. F., Pilliod D. S., Strickler K. M., Waits L. P., Fremier A. K., Takahara T., Herder J. E., Taberlet P. (2016) Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11): 1299–1307
- Hallam J., Clare E. L., Jones J. I., Day J. J. (2021) Biodiversity assessment across a dynamic riverine system: A comparison of eDNA metabarcoding versus traditional fish surveying methods. *Environmental DNA*, 3(6): 1247–1266
- Hänfling B., Lawson Handley L., Read D., Winfield I. (2016a) *Evidence. eDNA-based metabarcoding as a monitoring tool for fish in large lakes. Report – SC 140018/R*. Environment Agency
- Hänfling B., Lawson Handley L., Read D. S., Hahn C., Li J., Nichols P., Blackman R. C., Oliver A., Winfield I. J. (2016b) Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13): 3101–3119
- Harper L. R., Buxton A. S., Rees H. C., Bruce K., Brys R., Halfmaerten D., Read D. S., Watson H. V., Sayer C. D., Jones E. P., Priestley V., Mächler E., Múrria C., Garcés-Pastor S., Medupin C., Burgess K., Benson G., Boonham N., Griffiths R. A., Lawson Handley L., Hänfling B. (2019) Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 826(1): 25–41
- Hayami K., Sakata M. K., Inagawa T., Okitsu J., Katano I., Doi H., Nakai K., Ichiyanagi H., Gotoh R. O., Miya M., Sato H., Yamanaka H., Minamoto T. (2020) Effects of sampling seasons and locations on fish environmental DNA metabarcoding in dam reservoirs. *Ecology and Evolution*, 10(12): 5354–5367
- Helpman G. S. (2007) *Fish conservation: a guide to understanding and restoring global aquatic biodiversity and fishery resources*. Washington, Island Press

- Hillebrand H., Matthiessen B. (2009) Biodiversity in a complex world: consolidation and progress in functional biodiversity research. *Ecology Letters*, 12(12): 1405–1419
- Holman L. E., Chng Y., Rius M. (2022) How does eDNA decay affect metabarcoding experiments? *Environmental DNA*, 4(1): 108–116
- Jo T., Arimoto M., Murakami H., Masuda R., Minamoto T. (2020) Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2(2): 140–151
- Jo T., Murakami H., Masuda R., Sakata M. K., Yamamoto S., Minamoto T. (2017) Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6): e25–e33
- Johnson M. D., Cox R. D., Grisham B. A., Lucia D., Barnes M. A. (2021) Airborne eDNA reflects human activity and seasonal changes on a landscape scale. *Frontiers in Environmental Science*, 8: 563431
- Kirilchik S. V. (2018) Environmental DNA as a new tool for assessing the biodiversity of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology*, 1: 71–73
- Kumar G., Farrell E., Reaume A. M., Eble J. A., Gaither M. R. (2022) One size does not fit all: Tuning eDNA protocols for high- and low-turbidity water sampling. *Environmental DNA*, 4(1): 167–180
- Laporte M., Bougas B., Côté G., Champoux O., Paradis Y., Morin J., Bernatchez L. (2020) Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environmental DNA*, 2(3): 362–372
- Laporte M., Reny-Nolin E., Chouinard V., Hernandez C., Normandeau E., Bougas B., Côté C., Behmel S., Bernatchez L. (2021) Proper environmental DNA metabarcoding data transformation reveals temporal stability of fish communities in a dendritic river system. *Environmental DNA*, 3(5): 1007–1022
- Littlefair J. E., Hrenchuk L. E., Blanchfield P. J., Rennie M. D., Cristescu M. E. (2021) Thermal stratification and fish thermal preference explain vertical eDNA distributions in lakes. *Molecular Ecology*, 30(13): 3083–3096
- Macé B., Hocdé R., Marques V., Guerin P.-E., Valentini A., Arnal V., Pellissier L., Manel S. (2022) Evaluating bioinformatics pipelines for population-level inference using environmental DNA. *Environmental DNA*, 4(3): 674–686
- Macher T.-H., Schütz R., Arle J., Beermann A. J., Koschorreck J., Leese F. (2021) Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5: 59–71
- Marshall N. T., Vanderploeg H. A., Chaganti S. R. (2021) Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific Reports*, 11(1): 2769
- Maruyama A., Nakamura K., Yamanaka H., Kondoh M., Minamoto T. (2014) The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS ONE*, 9(12): e114639
- Mathon L., Valentini A., Guérin P.-E., Normandeau E., Noel C., Lionnet C., Boulanger E., Thuiller W., Bernatchez L., Mouillot D., Dejean T., Manel S. (2021) Benchmarking bioinformatic tools for fast and accurate eDNA metabarcoding species identification. *Molecular Ecology Resources*, 21(7): 2565–2579
- Mauvisseau Q., Halfmaerten D., Neyrinck S., Burian A., Brys R. (2021) Effects of preservation strategies on environmental DNA detection and quantification using ddPCR. *Environmental DNA*, 3(4): 815–822

- Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M., Iwasaki W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7): 150088
- Miyata K., Inoue Y., Amano Y., Nishioka T., Yamane M., Kawaguchi T., Morita O., Honda H. (2021) Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators*, 128: 107796
- Nguyen B. N., Shen E. W., Seemann J., Correa A. M. S., O'Donnell J. L., Altieri A. H., Knowlton N., Crandall K. A., Egan S. P., McMillan W. O., Leray M. (2020) Environmental DNA survey captures patterns of fish and invertebrate diversity across a tropical seascape. *Scientific Reports*, 10(1): 6729
- Olds B. P., Jerde C. L., Renshaw M. A., Li Y., Evans N. T., Turner C. R., Deiner K., Mahon A. R., Brueseke M. A., Shirey P. D., Pfrender M. E., Lodge D. M., Lamberti G. A. (2016) Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6(12): 4214–4226
- Pochon X., Zaiko A., Fletcher L. M., Laroche O., Wood S. A. (2017) Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications. *PLoS ONE*, 12(11): e0187636
- Polanco F. A., Richards E., Flück B., Valentini A., Altermatt F., Brosse S., Walser J.-C., Eme D., Marques V., Manel S., Albouy C., Dejean T., Pellissier L. (2021) Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems. *Environmental DNA*, 3(6): 1113–1127
- Rourke M. L., Fowler A. M., Hughes J. M., Broadhurst M. K., DiBattista J. D., Fielder S., Wilkes Walburn J., Furlan E. M. (2022) Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1): 9–33
- Saito T., Doi H. (2021) Degradation modeling of water environmental DNA: Experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environmental DNA*, 3(4): 850–860
- Sato Y., Miya M., Fukunaga T., Sado T., Iwasaki W. (2018) MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1553–1555
- Schenekar T., Schletterer M., Lecaudey L. A., Weiss S. J. (2020) Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. *River Research and Applications*, 36(7): 1004–1013
- Shogren A. J., Tank J. L., Egan S. P., Bolster D., Riis T. (2019) Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 64(8): 1467–1479
- Shokralla S., Spall J. L., Gibson J. F., Hajibabaei M. (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research: next-generation sequencing for environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8): 1794–1805
- Shu L., Ludwig A., Peng Z. (2020) Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes*, 11(3): 296
- Taberlet P., Bonin A., Zinger L., Coissac E. (2018) *Environmental DNA*. Oxford University Press
- The eDNA Society (2019) *Environmental DNA sampling and experiment manual, Version 2.1*. Otsu, Japan

- Thomsen P.F., Willerslev E. (2015) Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183: 4–18
- Trujillo-González A., Villacorta-Rath C., White N.E., Furlan E.M., Sykes M., Grossel G., Divi U.K., Gleeson D. (2021) Considerations for future environmental DNA accreditation and proficiency testing schemes. *Environmental DNA*, 3(6): 1049–1058
- Ushio M., Murakami H., Masuda R., Sado T., Miya M., Sakurai S., Yamanaka H., Minamoto T., Kondoh M. (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2: e23297
- Valdez-Moreno M., Ivanova N.V., Elías-Gutiérrez M., Pedersen S.L., Bessonov K., Hebert P.D. N. (2019) Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *PLoS ONE*, 14(4): e0215505
- Wang S., Yan Z., Hänfling B., Zheng X., Wang P., Fan J., Li J. (2021) Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment*, 755: 142622
- Wong M.K.-S., Nakao M., Hyodo S. (2020) Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports*, 10(1): 21531
- Wood S.A., Biessy L., Latchford J.L., Zaiko A., von Ammon U., Audrezet F., Cristescu M.E., Pochon X. (2020) Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Science of the Total Environment*, 704: 135314
- Yates M.C., Derry A.M., Cristescu M.E. (2021) Environmental RNA: a revolution in ecological resolution? *Trends in Ecology and Evolution*, 36(7): 601–609
- Yates M.C., Fraser D.J., Derry A.M. (2019) Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, 1(1): 5–13
- Zaiko A., von Ammon U., Stuart J., Smith K.F., Yao R., Welsh M., Pochon X., Bowers H.A. (2022) Assessing the performance and efficiency of environmental DNA/RNA capture methodologies under controlled experimental conditions. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(7): 1581–1594
- Zhang S., Zhao J., Yao M. (2020) A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(12): 1609–1625

EDN: HCCGTF

УДК 58.084 (571.1)

Certification of Samples in the Bioresource Collection USU 44053 CSBG SB RAS Using Digital Seed Library and Cytological and Genetic Methods

**Olga Yu. Vasilyeva^{*a},
Sultan Kh. Vyshegurov^b, Margarita V. Kozlova^a,
Alexander V. Agafonov^a and Olga V. Dorogina^{a, c}**

^a*Central Siberian Botanical Garden of the SB RAS*

Novosibirsk, Russian Federation

^b*Novosibirsk State Agricultural University*

Novosibirsk, Russian Federation

^c*Novosibirsk State University*

Novosibirsk, Russian Federation

Received 13.05.2022, received in revised form 18.09.2022, accepted 28.11.2022

Abstract. One of the current trends in research of botanical institutions is the creation of bioresource collections, which are used in scientific experiments, applied research, and education. In the Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (CSBG SB RAS), the bioresource collection USU 44053 is used not only for scientific research, but also for the training of bachelors and masters of biological and agricultural sciences. The purpose of the present work is to describe research methods employed in the CSBG SB RAS to certify resources and characterize specimens in bioresource collections of rare and economically valuable plants using modern molecular genetic approaches and digital technologies. The characterization of collection specimens is based on the most permanent features such as morphometric parameters of seeds. Micrographs of the digital seed library make it possible to describe the morphological features of seeds and carry out statistical processing of morphometric parameters using a Carl Zeiss Stereo Discovery V12 stereomicroscope with an AxioCam MRc-5 high-resolution digital sensor (AxioVision 4.8 software). In the work with the digital seed library, descriptive-morphological and statistical methods of data processing are used. To date, the digital library of the CSBG has more than 280 accessions, the species of the families Asteraceae,

© Siberian Federal University. All rights reserved

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

* Corresponding author E-mail address: vasil.flowers@rambler.ru

ORCID: 0000-0003-0730-3365 (Vasilyeva O.); 0000-0002-4180-1643 (Vyshegurov S.); 0000-0002-3347-5948 (Kozlova M.); 0000-0002-1403-5867 (Agafonov A.); 0000-0001-5729-3594 (Dorogina O.)

Brassicaceae, Caryophyllaceae, Poaceae, Rosaceae, and Solanaceae being the most diversely represented in it. The data on the morphology and morphometry of seeds of the species belonging to the families Amaranthaceae, Begoniaceae, Capparaceae, Hydrophyllaceae, Onagraceae, Paeoniaceae, Papaveraceae, Polemoniaceae, Scrophulariaceae, and Verbenaceae are also used in the educational process. Additional characterization is provided by microphotographs of karyotypes, which reveal chromosome races among representatives of intraspecific diversity. Storage proteins of mature seeds are the most convenient markers for studying intra- and interspecific variability and specifying taxonomic diversity, for related species as well. Therefore, electrophoretic analysis of the composition of seed storage proteins is an effective method for characterizing plant genotypes included in the bioresource collections. An important characteristic of the samples included in bioresource collections is the description of their reproductive systems, in particular, seed formation under different pollination modes. Electrophoretic analysis used to identify the types of seed reproduction in perennial grasses of the *Triticeae* tribe showed that in all species of *Elymus* L., the spectra of sister grains were highly identical, supporting the idea of self-pollination being the main reproduction type of the species of this genus. By contrast, in *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn., the spectra of the seeds of the same plant showed high heterogeneity, indicating cross-pollination and multiple allelism in the genes that control prolamin proteins.

Keywords: bioresource collection, digital seed library, karyotype, storage protein electrophoresis, *Hordeum vulgare* L., *Matthiola incana* (L.) Aiton., *Salvia splendens* Sellow ex Schult., *Elymus* L., *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn., *Elytrigia repens* (L.) Desv. ex Nevski, *Elytrigia geniculata* (Trin.) Nevski, *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski, *Hordeum jubatum* L.

Acknowledgements: This study was conducted within the framework of state assignments for Central Siberian Botanical Garden SB RAS (project “Analysis of biodiversity, conservation and restoration of rare and resource plant species using experimental methods”, No. AAAA21-121011290025-2) and with the financial support of the FSUS-2021-0012 project “Ecosystems of grass pine and small-leaved forests as regulators of nitrogen and carbon balance in the forest-steppe landscape of Western Siberia”. The materials of the bioresource scientific collection of the CSBG SB RAS – USU 44053 “Collections of living plants in open and closed ground” were used in the experiments.

Citation: Vasilyeva O. Yu., Vyshegurov S. Kh., Kozlova M. V., Agafonov A. V., Dorogina O. V. Certification of samples in the bioresource collection USU 44053 CSBG SB RAS using digital seed library and cytological and genetic methods. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2023, 16(1), 24–40. EDN: HCCGTF.



**Паспортизация объектов биоресурсной коллекции
USU 44053 ЦСБС СО РАН
с использованием цифровой семенотеки
и цитолого-генетических методов**

О. Ю. Васильева^a, С. Х. Вышегуров^б,

М. В. Козлова^a, А. В. Агафонов^a, О. В. Дорогина^{a, в}

^aЦентральный сибирский ботанический сад СО РАН

Российская Федерация, Новосибирск

^бНовосибирский государственный аграрный университет

Российская Федерация, Новосибирск

^вНовосибирский национальный

исследовательский государственный университет

Российская Федерация, Новосибирск

Аннотация. Одним из современных направлений исследований ботанических учреждений является создание биоресурсных коллекций, которые используются для проведения научных экспериментов, прикладных разработок и в образовательном процессе. В Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН на базе биоресурсной коллекции USU 44053 проводятся не только научные исследования, но также подготовка бакалавров и магистрантов биологических и сельскохозяйственных специальностей. Цель работы – описание методов, используемых в ЦСБС СО РАН для паспортизации и характеристики объектов биоресурсных коллекций редких и хозяйствственно-ценных растений с использованием современных молекулярно-генетических методов и цифровых технологий. Для характеристики коллекционных образцов привлекаются наиболее константные признаки, например морфометрические показатели семян. Микрофотографии цифровой семенотеки позволяют описать морфологические признаки семян и провести статистическую обработку морфометрических параметров с использованием стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V12 с цифровой камерой высокого разрешения AxioCam MRc-5 (программное обеспечение AxioVision 4.8). При работе с цифровой семенотекой используются описательно-морфологический и статистический методы обработки данных. К настоящему времени цифровая семенотека ЦСБС насчитывает более 280 образцов, наиболее широко в ней представлены виды семейств Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Poaceae, Rosaceae, Solanaceae. Также в учебном процессе используются сведения по морфологии и морфометрии семян видов, входящих в семейства Amaranthaceae, Begoniaceae, Capparaceae, Hydrophyllaceae, Onagraceae, Paeoniaceae, Papaveraceae, Polemoniaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae. Дополнительной характеристикой являются микрофотографии кариотипов, позволяющие выявить среди представителей внутривидового разнообразия коллекционных образцов хромосомные расы. Для изучения внутри- и межвидовой изменчивости и уточнения таксономического разнообразия, в том числе родственных видов, наиболее удобными маркерами являются запасные белки зрелых семян. Поэтому электрофоретическое исследование состава запасных белков семян является эффективным методом характеристики генотипов растений, входящих в биоресурсные

коллекции. Важной характеристикой объектов, входящих в биоресурсные коллекции, является описание присущих им систем размножения, в частности завязывания семян при различных способах опыления. Проверка возможности использования электрофоретического метода с целью идентификации способов семенной репродукции у многолетних злаков трибы *Triticeae* показала, что у всех видов *Elymus* L. спектры сестринских зерновок в высокой степени идентичны, что подтверждает представление о само опылении как основной форме размножения видов этого рода. У *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn., напротив, спектры характеризовались высокой гетерогенностью семян с индивидуального растения, что является показателем перекрестного опыления при наличии множественного аллелизма по генам, контролирующим проламиновые белки.

Ключевые слова: биоресурсная коллекция, цифровая семенотека, кариотип, электрофорез запасных белков, *Hordeum vulgare* L., *Matthiola incana* (L.) Aiton., *Salvia splendens* Sellow ex Schult., *Elymus* L., *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn., *Elytrigia repens* (L.) Desv. ex Nevski, *Elytrigia geniculata* (Trin.) Nevski, *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski, *Hordeum jubatum* L.

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН – Проекта «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» (номер госрегистрации AAAA-A21-121011290025-2), а также при финансовой поддержке проекта № FSUS-2021-0012 «Экосистемы травяных сосновых и мелколиственных лесов как регуляторы азотного и углеродного баланса в лесостепном ландшафте Западной Сибири». В экспериментах использовались материалы биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН – USU 44053 «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте».

Цитирование: Васильева, О. Ю. Паспортизация объектов биоресурсной коллекции USU 44053 ЦСБС СО РАН с использованием цифровой семенотеки и цитолого-генетических методов / О. Ю. Васильева, С. Х. Вышегуров, М. В. Козлова, А. В. Агафонов, О. В. Дорогина // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 24–40. EDN: HCCGTF.

Введение

Одним из важнейших направлений исследований отечественных и зарубежных ботанических садов является изучение и сохранение растительного биоразнообразия, а также обоснование его рационального использования (Volis, Blecher, 2010; Heywood, Iriondo, 2003; Новикова, 2013). Традиционно данные работы проводятся как *in situ*, так и *ex situ*. Особую теоретическую значимость имеет изучение внутривидового полиморфизма в естественных местообитаниях, а прикладным аспектом является поиск в природе видов и форм с потенциальными хозяйствственно-ценными признаками.

К числу новейших научных направлений относится создание биоресурсных коллекций (Васильева и др., 2018), под которыми, согласно определению Минобрнауки, понимается «научно-систематизированное, документированное и гарантированно сохраняемое на долгосрочной основе собрание биологических объектов естественного и (или) искусственного происхождения, обладающее общим набором специфических характеристик, использующееся для проведения научных исследований, прикладных разработок и (или) образовательного процесса». Иными словами это – систематизированные хранилища био-

логического материала в любых комбинациях и формах. Как правило, коллекции собираются десятилетиями и описывают огромное число образцов (https://minobrnauki.gov.ru/documents/?ELEMENT_ID=36155; Лашин и др., 2018).

Имеющиеся и создаваемые коллекции сельскохозяйственных растений и их дикорастущих сородичей, такие как УНУ «Генетическая коллекция растительных ресурсов ВНИИССОК» (<http://ckp-rf.ru/usu/508567/>) и УНУ «Коллекция генетических ресурсов риса, овощных и бахчевых культур» (<http://www.vniirice.ru/page/structure/semennaya-kollekciya-fgbnu-vnii-risa>), имеют непосредственное отношение к исполнению Указа Президента Российской Федерации № 350 от 21.07.2016 г. «О мерах по реализации государственной научно-технической политики в интересах развития сельского хозяйства». Оценка устойчивости и продуктивности образцов подобных коллекций является важным прикладным аспектом исследований (Осипова, 2021).

В условиях сибирского региона крупнейшей биоресурсной коллекцией является ГенАгро, созданная на базе генетической коллекции растений ИЦиГ СО РАН и коллекции полевых культур СибНИИРС, насчитывающая в настоящее время более 11 тысяч образцов. Это линии, сорта, гибриды и дикорастущие формы растений, по которым имеется информация об их морфологических, физиологических, биохимических и генетических характеристиках. Центр коллективного пользования ГенАгро предоставляет образцы коллекционного материала научным организациям и высшим учебным заведениям для проведения исследований в области генетики и селекции растений (<http://ckp.icgen.ru/plants/>).

В Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (г. Новосибирск) в биоресурсную коллекцию USU № 440534 входят кол-

лекция редких и исчезающих видов, а также коллекция декоративных растений.

Многолетние наблюдения за видами, формами и сортами – коллекционными образцами – позволяют накопить и статистически обработать данные по их сезонному развитию, онтогенезу, морфогенезу и репродуктивной биологии. Многие признаки, особенно количественные, обладают высокой экологической пластичностью, подвержены влиянию конкретных метеоусловий периодов зимовки и вегетации. Однако для описания образцов в качестве объектов биоресурсных коллекций необходимо выбирать наиболее константные показатели (Сарлаева, Васильева, 2021).

Цель настоящей работы – описание методов, используемых в ЦСБС СО РАН для паспортизации и характеристики объектов биоресурсных коллекций редких и хозяйственно-ценных растений с использованием современных молекулярно-генетических методов и цифровых технологий.

Цифровая семенотека

К числу наиболее константных признаков относятся морфометрические характеристики семян, которые иногда даже используются в качестве диагностических признаков, особенно при привлечении современных возможностей сканирующей электронной микроскопии. Поэтому для проведения научных исследований и использования в образовательном процессе возможностей биоресурсной коллекции ЦСБС было начато создание цифровой семенотеки (Васильева, Сарлаева, 2021). Первыми объектами стали виды однолетних красивоцветущих и декоративно-лиственных растений, а также декоративных злаков. На первом этапе цифровая семенотека составлялась за счет морфологических описаний и получения морфометрических характеристик семян местной репродукции видов однолетних декоративных

растений, собранных на экспериментальных участках, входящих в биоресурсную коллекцию ЦСБС (сем. Amaranthaceae, Asteraceae, Begoniaceae, Brassicaceae, Capparaceae, Caryophyllaceae, Hydrophyllaceae, Onagraceae, Paeoniaceae, Papaveraceae, Polemoniaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Verbenaceae). В дальнейшем были описаны семена различных образцов, собранных в процессе экспедиций в естественных местообитаниях (сем. Asteraceae, Caryophyllaceae, Paeoniaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rosaceae).

Описание формы семян и поверхности семенной кожуры проводилось по общепринятым методикам (Дымина, Черемушкина, 2003) с использованием стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V12 с цифровой камерой высокого разрешения AxioCam MRc-5 (программное обеспечение AxioVision 4.8). Полученные морфометрические параметры использовались для статистической обработки, которая проводилась с применением программы Excel (Доспехов, 1985).

Снимки семян в одном поле зрения делались дважды (рис. 1). На первом снимке, используемом для описания цвета, формы и скульптуры поверхности, проставлялась масштабная линейка (1 мм). На втором снимке того же поля зрения у выполненных семян

указывались конкретные параметры длины и ширины, а у имеющих округлую форму – диаметр.

В случае с крупными семенами делался третий снимок уже другого поля зрения, чтобы получить по 10–12 параметров длины и ширины (рис. 2).

Этого числа измерений оказалось достаточно для подавляющего большинства образцов (табл. 1), чтобы собрать статистически достоверные данные о размерах семян (относительная ошибка не превышала 5 %).

Данные морфометрические характеристики дополняют сведения, касающиеся потенциальной и реальной семенной продуктивности, что в совокупности является одним из важнейших показателей успешности интродукции конкретных таксонов.

Высокая информативность цифровой семенотеки заключается в подборе достаточно унифицированных (посредством использования стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V12) оцифрованных изображений в отличие от разрозненных микрофотографий, выполненных с использованием различной микротехники. Материалы по работе с цифровой семенотекой включены в рабочую тетрадь (Васильева, 2021), что позволяет студентам изучить широкий спектр

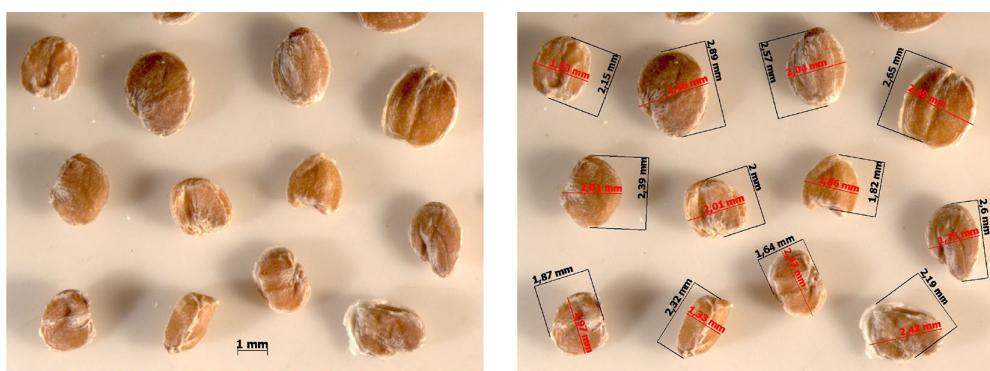


Рис. 1. *Matthiola incana* (L.) Aiton. Форма (слева) и размеры (справа) семян

Fig. 1. *Matthiola incana* (L.) Aiton. Shape (left) and size (right) of seeds



Рис. 2. *Salvia splendens* Sellow ex Schult. Размеры семян в первом (слева) и втором (справа) поле зрения
Fig. 2. *Salvia splendens* Sellow ex Schult. Seed sizes in the first (left) and second (right) fields of view

Таблица 1. Размеры семян однолетних и многолетних декоративных растений

Table 1. Seed sizes of annual and perennial ornamental plants

Вид	Размеры семян, мм	Статистические показатели		
		$\bar{x} \pm S_x$	V%	$S_{x\%}$
<i>Matthiola incana</i>	длина	$2,34 \pm 0,10$	14,10	4,27
	ширина	$1,97 \pm 0,09$	16,24	4,57
<i>Salvia splendens</i>	длина	$3,00 \pm 0,05$	5,33	1,67
	ширина	$1,81 \pm 0,05$	8,84	2,76
<i>Festuca glauca</i>	длина	$5,45 \pm 0,21$	12,11	3,85
	ширина	$0,78 \pm 0,03$	14,10	3,88

Примечание: x – средняя арифметическая; S_x – ошибка средней; V% – коэффициент вариации; $S_{x\%}$ – относительная ошибка средней

видов на практических занятиях. Таким образом, при работе с цифровой семенотекой на первом этапе используются описательно-морфологический и статистический методы обработки данных. Анализ образцов семян однолетних декоративных растений показал, что *Ageratum houstonianum*, *Amaranthus caudatus*, *A. paniculatus*, *Arctotis stoechadifolia*, *Brachycome iberidifolia*, *Gilia capitata*, *G. tricolor*, *Godetia amoena*, *Iberis amara*, *I. umbellata*, *Lavatera trimestris*, *Mentzelia lindleyi*, *Mimulus luteus*, *Nicandra physaloides*, *Phacelia tanacetifolia*, *Salpiglossis sinuata*, *Salvia splendens*, *Venidium fastuosum* образуют в местных условиях выполненные качествен-

ные семена, что подтвердилось в дальнейшем их высокой лабораторной, тепличной, а у образцов, размножаемых подзимним и весенним посевом, – и грунтовой всхожестью.

Хромосомный анализ

Цитологические исследования выполняются согласно рекомендациям Центра кол-лективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ЦСБС СО РАН (Красников и др., 2016). Семена зерновой культуры (*Hordeum vulgare* L.) помещаются в чашки Петри на предварительно смоченную дистиллированной водой фильтровальную бумагу и прорашиваются при комнатной

температуре (+20°C) до появления всходов, периодически увлажняя.

Процесс приготовления давленых препаратов для кариологического анализа состоит из предварительной обработки растительного материала, фиксации, окраски и собственно приготовления препарата. Предфиксационная обработка материала проводится в 0,2 % растворе колхицина в течение 2-х часов, фиксация материала в фиксаторе Кларка.

Ряд объектов наших исследований относится к категории редких видов или находящихся под угрозой исчезновения (Новикова, Дорогина, 2010), а также не отличается высокой семенной продуктивностью (Фомина, 2012), кроме того семенам некоторых видов присущ не вынужденный, а глубокий покой (Vasil'eva, 2009). Поэтому при освоении студентами и аспирантами семеноведческих и цитологических методик нами задействованы представители сем. Мятликовые (Poaceae), отличающиеся крупными зерновками, находящимися в состоянии вынужденного покоя, традиционно используемые в качестве сидератов (рис. 3). *Hordeum vulgare* является одним из основных модельных объектов, используемых в учебном процессе. На рис. 3 показан микропрепарат кариотипа, выполненный в рамках подготовки магистерской диссертации. После освоения

методик на модельных объектах приступают к цитологическим исследованиям коллекционных образцов.

Электрофоретические спектры проламинов и запасных белков семени

Важной характеристикой объектов, входящих в биоресурсные коллекции, является описание присущих им систем размножения, в частности завязывания семян при различных способах опыления (ксеногамии, автогамии, гейтоногамии) или апомиктическим путем. В ЦСБС интересными модельными объектами для изучения ксеногамии, перманентной нечетной полиплоидии (Грант, 1984), а также автогамии является родовой комплекс *Rosa* L. (Vasil'eva, 2009), а также родовой комплекс *Elymus* L. (Пырейник), многие представители которого используются в качестве кормовых или декоративных злаков. В условиях континентального климата виды пырейников *ex situ* можно размножать вегетативно, а также семенами (рис. 4).

В биоресурсной коллекции ЦСБС каждый вид пырейника представлен большим числом образцов, собранных из различных частей природного ареала. Исходные местонахождения образцов и авторы сбора приведены в табл. 2. Изучались семена дикорастущих

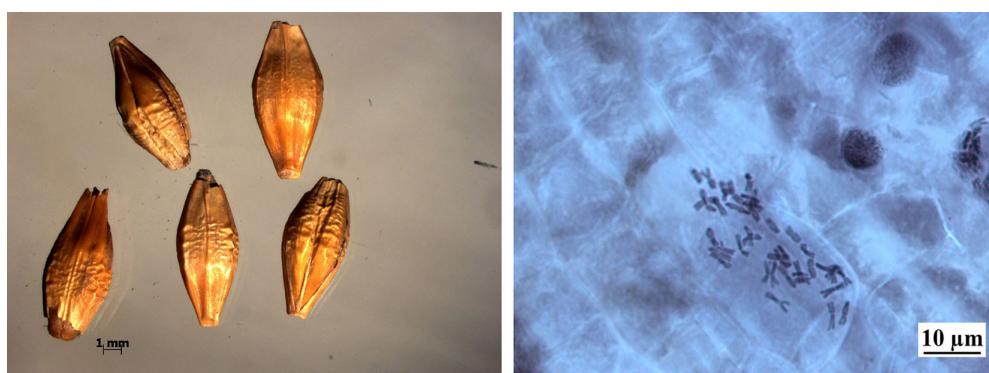


Рис. 3. *Hordeum vulgare* L. Форма семян (слева) и общий вид кариотипа (справа)

Fig. 3. *Hordeum vulgare* L. The shape of the seeds (left) and the general appearance of the karyotype (right)

растений видов *Elymus*, собранные авторами в Сибири, в Приморском крае, а также в Западном и Центральном Тянь-Шане в пределах Республики Кыргызстан. Экстракцию и разделение проламинов из изолированного

эндосперма индивидуальных зерновок проводили по ранее описанным методикам (Агафонов, Агафонова, 1990; Агафонова, Агафонов, 1991), а процедуры по выделению суммарных запасных белков эндосперма и электро-

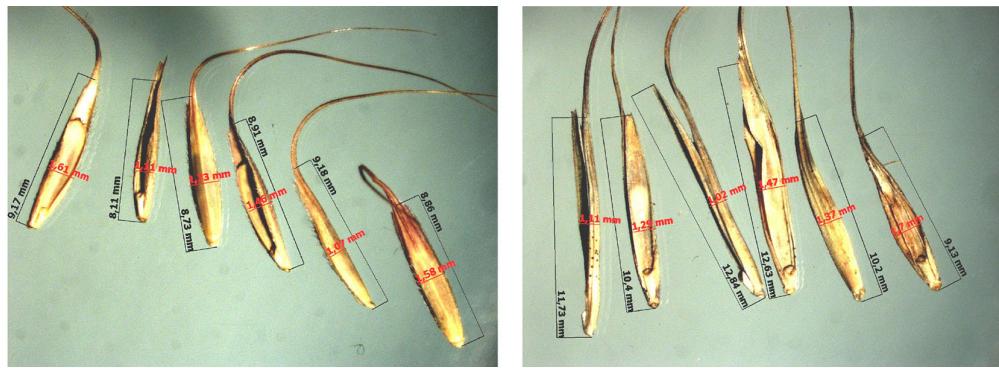


Рис. 4. *Elymus ciliaris* (Trin.) Tzvel. (слева) и *Elymus sibiricus* L. (справа)

Fig. 4. *Elymus ciliaris* (Trin.) Tzvel. (left) and *Elymus sibiricus* L. (right)

Таблица 2. Происхождение образцов видов *Elymus* L., используемых в данной работе

Table 2. Origins of *Elymus* L. specimens used for the current research

Вид	Код образца (популяции)	Местонахождение, автор сбора
<i>E. sibiricus</i> L.	ALT-8401	Респ. Алтай, Шебалинский р-н, окр. пос. Топучая (А. Красников)
<i>E. pendulinus</i> (Nevski) Tzvel.	VLA-8601	Приморский кр., окр.г. Владивостока (А. Агафонов, О. Агафонова)
<i>E. pendulinus</i>	MES-8608	Приморский кр., Хасанский р-н, окр. пос. Анисимовка (А. Агафонов, О. Агафонова)
<i>E. pendulinus</i>	GAL-8913	Респ. Алтай, Онгудайский р-н, дол.р. Б. Ильгумень (А. Агафонов, О. Агафонова)
<i>E. fedtschenkoi</i> Tzvel.	CHA-8745	Кыргызстан, Зап. Тянь-Шань, хр. Чандалаш (А. Агафонов, О. Агафонова)
<i>E. praecaespitosus</i> (Nevski) Tzvel.	CHA-8708	то же
<i>E. praecaespitosus</i>	CUR-8803	Кыргызстан, Центр. Тянь-Шань, хр. Терской Ала-Тоо, окр. пос Каджи-Сай (А. Агафонов, О. Агафонова)
<i>E. caninus</i> (L.) L.	BEL-93	Алтайский кр., Смоленский р-н, окр. пос. Белокуриха, галечник вдоль р. Белокурихи (А. Агафонов)
<i>E. nutans</i> Griseb.	PMR-8902	Зап. Памир, окр.г. Хорог (И. Красноборов)
<i>E. nutans</i>	BAR-8801 BAR-8804	Кыргызстан, Центр. Тянь-Шань, хр. Терской Ала-Тоо, ущ. Барскаун (А. Агафонов, О. Агафонова)
<i>E. tschimganicus</i> (Drobow) Tzvelev	BAR-8803	то же

форез – по методике U.K. Laemmli (1970) с модификациями для многолетних злаков (Агафонов, Агафонова, 1992). В алюминий-лактатной и в SDS-системе ПААГ-электрофореза изучали спектры проламинов из индивидуальных зерновок с одного или с нескольких растений из разных видов и родов.

К сожалению, не всегда удается отличить один вид от другого только по морфологическим признакам, особенно если они близкородственные. Широкая морфологическая изменчивость, особенно у видов преимущественно с перекрестным типом опыления, спонтанная межвидовая и межродовая гибридизация значительно осложняют идентификацию растений и, следовательно, таксономическую классификацию. Крайне затруднен анализ морфологически однородных популяций, идентификация и маркирование особей, не имеющих внешних фенотипических различий. При изучении этой изменчивости появляется ряд проблем, например выявление индивидуальной изменчивости и, в частности, гибридных растений. Для этого необходимо использовать метод, позволяющий анализировать отдельные семена, независимо от их массы. Разработанная нами методика экстракции электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (ПААГ) проламинов у многолетних представителей трибы *Triticeae* (Пшеницевые) позволяет идентифицировать генотипы с массой эндосперма 0,1–1,0 мг, отделяя при этом оболочку и зародыш. Разрешающей способности метода достаточно, чтобы анализировать половину зерновки, а оставшуюся часть вместе с зародышем прорачивать и получать взрослое растение с известным исходным составом проламиновых компонентов спектра (Агафонов, Агафонова, 1990; Агафонова, Агафонов, 1991).

С помощью запасных белков зерновки можно проводить анализ не только внутри-

и межпопуляционной изменчивости для выявления генетического полиморфизма, для уточнения видовой принадлежности, а также определить, какой тип опыления присущ конкретному образцу, не проводя полевых опытов с изоляцией соцветий.

Для идентификации самоопыляющихся видов *Elymus* (в SDS-системе ПААГ-электрофореза) в анализ были взяты по 6 зерновок с каждого растения из алтайской популяции *E. caninus* BEL-93 (рис. 5). На рисунке показаны спектры зерновок с четырех растений популяции. Все сестринские зерновки были полностью идентичны (мономорфны) при незначительных различиях между растениями.

Это означает отсутствие генетического расщепления и, следовательно, высокий уровень гомозиготности растений характерен для данной популяции. В целом в результате анализа этих электрофоретических спектров выявлена полная идентичность спектров внутри каждого растения, но при этом обнаружена небольшая внутрипопуляционная изменчивость.

При анализе дальневосточных видов *E. nutans* (35 растений) и *E. pendulinus* (23 растения) (по 2 зерновки с каждого растения) (рис. 6) мы обнаружили полную идентичность спектров внутри пары каждого вида, несмотря на значительные отличия между некоторыми растениями одного вида *E. praecaespitosus* (рис. 6, образец № 8). Случай неполного совпадения проламиновых спектров у сестринских зерновок отмечались у *E. tschimganicus* из Центрального Тянь-Шаня (рис. 6, образец № 10), что свидетельствует о возможности переопыления, обеспечивающего некоторый уровень гетерозиготности в природных популяциях. При этом для каждого вида был характерен свой специфический спектр проламинов.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что для полной характеристики по белкам эндосперма для видов

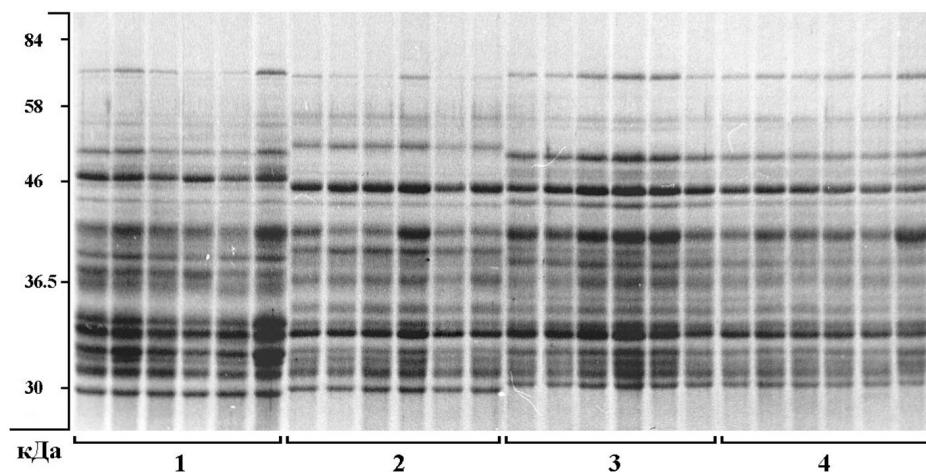


Рис. 5. SDS-электрофорограмма белков эндосперма с индивидуальных растений *E. caninus* (1–4) из популяции BEL-93. Полипептидные спектры отдельных зерновок в варианте с обработкой экстрактов редуцирующим агентом 2-меркаптоэтанол (+ Me)

Fig. 5. SDS-electrophoregram of endosperm proteins from individual *E. caninus* plants (1–4) from the BEL-93 population. Polypeptide spectra of individual grains in the variant with the treatment of extracts with the reducing agent 2-mercaptoethanol (+ Me)

рода *Elymus* достаточно двух-трех отдельных зерновок с растения, если не ставятся другие специальные задачи, например изучение внутри- и межпопуляционной изменчивости в пределах одного вида и др.

Электрофоретические спектры проламинов при необходимости можно использовать и для межродовой идентификации, а также для выявления типа опыления в роде в целом.

На рис. 7 можно видеть, что представители родов с перекрестным типом опыления (*Agropyron*, *Elytrigia*, *Psathyrostachys*) характеризуются изменчивостью компонентного состава проламинов даже у сестринских зерновок. При этом идентичность проламиновых спектров у зерновок вида *Hordeum jubatum* не случайна и может свидетельствовать о самоопылении вида как форме семенного размножения.

Таким образом, характер полипептидных спектров запасных белков эндосперма может служить критерием уровня гетерогенности популяций, что можно использовать как один из критериев для идентификации

и паспортизации популяций, видов и коллекции в целом. Метод применим также для объективного изучения динамики репродуктивных процессов, а также в целях мониторинга популяций в случаях истощения генофонда при антропогенном воздействии.

Особую теоретическую ценность в биоресурсных коллекциях имеют родовые комплексы, представленные образцами, собранными из различных частей ареала конкретных видов, позволяющие более углубленно изучать их генофонд, выявлять внутривидовые категории и хромосомные расы и в дальнейшем вовлекать их в селекцию.

Так, для идентификации и регистрации конкретных генотипов с помощью проламинов и глютелинов можно выявлять гибридные сорта и виды (Асбаганов и др., 2014; Губарева и др., 2015; Вишнякова, Гончаров, 2019), изучать внутрипопуляционные и внутривидовые пуллы и устанавливать межвидовые и геномные различия (Badaeva et al., 2019; Baum et al., 2011; Grigoreva et al., 2019).

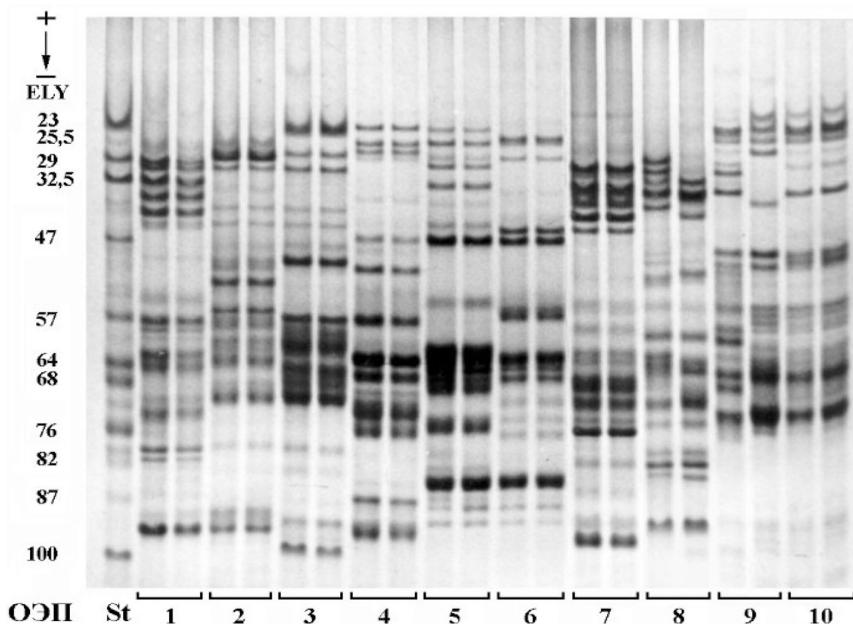


Рис. 6. Электрофореграммы проламинов разных видов *Elymus* L. Спектры проламинов сестринских зерновок в алюминий-лактатной гелево-буферной системе. *E. nutans*: 1. PMR-8902 (Памир); 2. BAR-8801; 3. BAR-8804 (Центр. Тянь-Шань). *E. pendulinus*: 4. VLA-8601 (г. Владивосток); 5. MES-8608 (Прим. край.); 6. GAL-8913 (Респ. Алтай). 7. *E. fedtschenkoi*: CHA-8745; *E. praecaespitosus*: 8. CHA-8708 (Зап. Тянь-Шань); 9. CUR-8803 (Центр. Тянь-Шань). 10. *E. tschimganicus*: BAR-8803 (Центр. Тянь-Шань). ОЭП – относительная электрофоретическая подвижность компонентов; St – эталонный спектр линии *E. sibiricus*

Fig. 6. Electrophoregrams of prolamins of different *Elymus* L. species. Spectra of prolamins of sister grains in an aluminum-lactate gel-buffer system. *E. nutans*: 1. PMR-8902 (Pamir); 2. BAR-8801; 3. BAR-8804 (Central Tien Shan). *E. pendulinus*: 4. VLA-8601 (Vladivostok); 5. MES-8608 (Primorsky Krai); 6. GAL-8913 (Altai Republic). 7. *E. fedtschenkoi*: CHA-8745; *E. praecaespitosus*: 8. CHA-8708 (Tien Shan); 9. CUR-8803 (Central Tien Shan). 10. *E. tschimganicus*: BAR-8803 (Central Tien Shan). ОЭП – relative electrophoretic mobility of components; St – reference spectrum of the ALT-8401 *E. sibiricus* line

Авторами при изучении внутри- и межпопуляционной изменчивости на ряде объектов показано, что каждая популяция и каждый вид характеризуются различной изменчивостью и специфической картиной распределения компонентов запасных белков семени (Тарвердян и др., 2013; Есимбекова и др., 2015; Pomortsev et al., 2019).

Также, например, неоднократно высказывалось мнение, что для проламинов всех представителей трибы *Triticeae* характерно сходное распределение компонентов, и для их регистрации может быть применена единая номенклатура, разработанная для хлебных

культур (Конарев и др., 1983; Конарев, 2002). Результаты наших исследований не подтвердили этот тезис в отношении многолетних злаков трибы. Каждому таксону родового уровня свойственно специфическое распределение проламиновых компонентов на электрофореграммах, обусловленное их свойствами на молекулярно-генетическом уровне. Видимо, можно говорить о специфической архитектонике спектра, отражающей эволюцию базисных геномов (гапломов) или их стабильных комбинаций. По нашему мнению, многообразие молекулярных форм проламиновых белков многолетних злаков

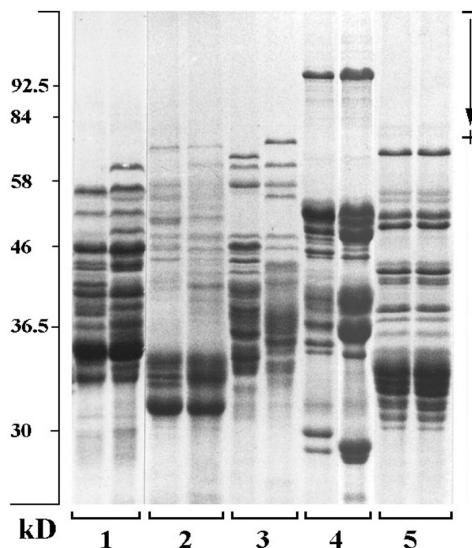


Рис. 7. SDS-электрофореграммы белков эндосперма у разных видов *Triticeae*. Полипептидные спектры сестринских зерновок в варианте с обработкой экстрактов редуцирующим агентом 2-меркаптоэтанол (+Me). Перекрестно опыляющиеся виды (1–4): 1. *Agropyron cristatum*; 2. *Elytrigia repens*; 3. *Elytrigia geniculata*; 4. *Psathyrostachys juncea*; 5. Самоопыляющийся вид *Hordeum jubatum*. kD – ориентировочная шкала молекулярных масс

Fig. 7. SDS-electrophoregrams of endosperm proteins in different species of *Triticeae*. Polypeptide spectra of sister grains in the variant with the treatment of extracts with the reducing agent 2-mercaptopethanol (+Me). Cross-pollinated species (1–4): 1. *Agropyron cristatum*; 2. *Elytrigia repens*; 3. *Elytrigia geniculata*; 4. *Psathyrostachys juncea*; 5. Self-pollinated species *Hordeum jubatum*. kD – approximate scale of molecular weights

не позволяет вести регистрацию отдельных компонентов спектра иначе, чем через величину относительной электрофоретической подвижности (ОЭП).

Дальнейшее развитие молекулярных методов исследований помогло создать новые тест-системы, позволившие анализировать генетический полиморфизм на уровне продуктов генов (белковый или биохимический полиморфизм) и на уровне генетического материала клетки (полиморфизм ДНК).

В настоящее время обсуждаются проблемы молекулярного полиморфизма и возможности его использования для решения теоретических и прикладных проблем генетических ресурсов растений, селекции. Адаптивный характер полиморфизма наиболее широко используемых белковых маркерных систем рассматривается как важнейший

аргумент для успешного использования белковых спектров не только в идентификации генетических ресурсов растений, но и для генетической дифференциации биоразнообразия, а также анализа генетических процессов, происходящих в популяциях в естественных условиях, в ходе репродукции, селекции и селеноводства (Конарев, 2002).

Заключение

Таким образом, при описании образца, входящего в биоресурсную коллекцию, следует внести в цифровую семенотеку микротографии, характеризующие форму, размеры семян и кариотип образца (на основании метафазных пластинок в корешках проростков данных семян).

Современный хромосомный анализ – это не просто описание кариотипа, а изучение хро-

мосом с помощью комплекса методов, позволяющих получать разностороннюю информацию об изучаемом объекте. Для этого проводится идентификация хромосом с использованием дифференциального окрашивания, гибридизации *in situ*, анализа изображения, определение локализации отдельных генов и их семейств и т.п. Такие исследования имеют общебиологическое значение, так как позволяют установить главные принципы организации генома растений в целом и их отдельных хромосом, выявить общие черты структуры генов и их регуляторных участков, рассмотреть соотношение функционально активной (генной) части хромосомы и различных не кодирующих белки межгенных участков ДНК. Хромосомные технологии в обозримом будущем приобретут большое значение и для эволюционной геномики растений.

В последние годы биологи все яснее осознают недостатки изучения только морфологических особенностей организма, поэтому там, где это целесообразно при решении ряда задач, в частности вопросов таксономии, филогении, эволюции, сохранения генофондов видов растений и т.д., используют молекулярно-генетические методы. Поэтому еще одним перспективным направлением работы с биоресурсными коллекциями является оптимизация сохранения генофондов редких и хозяйствственно-ценных видов растений, перспективных популяций, отдельных форм и сортов посредством их молекулярно-генетической паспортизации и идентифика-

ции, включая оценку внутри- и межпопуляционной изменчивости, а также выявление типа опыления по полипептидным спектрам семян.

Наши исследования подтверждают данные, полученные рядом авторов о том, что наиболее удобными маркерами в этом отношении являются электрофоретические спектры многокомпонентных, или множественных, и генетически полиморфных белков семян с хорошо выраженной внутривидовой изменчивостью. По сравнению с другими методами идентификации, они позволяют оптимизировать характеристики генофондов разных видов растений с учетом показателей генетического разнообразия. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация генофондов видов растений даёт возможность проведения отбора в природных условиях популяций и их групп, как с наиболее типичными, так и со специфичными характеристиками. Это необходимо для оптимизации сохранения генетического разнообразия и экологического статуса популяций и позволяет на основании относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) запасных белков составить молекулярно-генетическую формулу популяции, вида и обобщить данные в виде генетического паспорта. Создание генбанков представляет собой чрезвычайно важную часть экологических исследований, так как оно направлено на сохранение информации о генетическом разнообразии растений из местных условий различных регионов мира.

Список литературы / References

Агафонов А.В., Агафонова О.В. (1990) Внутривидовая изменчивость проламинов пырейника сибирского, выявляемая методом одномерного электрофореза. *Генетика*, 2: 304–311 [Agafonov A. V., Agafonova O. V. (1990) Intraspecific variability of prolamins of Siberian wheatgrass, revealed by one-dimensional electrophoresis. *Genetics [Genetika]*, 2: 304–311 (in Russian)]

Агафонова О.В., Агафонов А.В. (1991) Повышение разрешающей способности электрофоретического метода для таксономических и генетико-селекционных исследований многолет-

них злаков трибы Пшеницевые (*Triticeae*). Деп. ВИНИТИ, № 2467 – В 91, 11 с. [Agafonova O. V., Agafonov A. V. (1991) *Improving the resolution of the electrophoretic method for taxonomic and genetic-breeding studies of perennial grasses of the tribe Wheat (Triticeae)*. Dep. VINITI, N 2467 – В 91, 11 p. (in Russian)]

Агафонов А.В., Агафонова О.В. (1992) Электрофоретические спектры проламина у образцов пырея бескорневищного различного происхождения. *Генетика*, 11: 1992–2001 [Agafonov A. V., Agafonova O. V. (1992) *Electrophoretic spectra of prolamin in samples of couch grass of various origins. Genetics* [Genetika], 11: 1992–2001 (in Russian)]

Асбаганов С.В., Кобозева Е.В., Агафонов А.В. (2014) Применение электрофореза запасных белков семядолей и ISSR-маркеров для идентификации гибридов между *Sorbus sibirica* Hedl. и *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 18(3): 486–496 [Asbaganov S. V., Kobozeva E. V., Agafonov A. V. (2014) Application of the electrophoresis of cotyledon proteins and ISSR-markers to the identification of hybrids between *Sorbus sibirica* Hedl. and *Sorbocotoneaster pozdnjakovii* Pojark. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* [Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii], 18(3): 486–496 (in Russian)]

Васильева О.Ю. (2021) *Однолетние и двулетние декоративные растения: рабочая тетрадь*. Новосибирск, изд-во Новосибирского ГАУ, 39 с. [Vasilyeva O. Yu. (2021) *Annual and biennial ornamental plants: a workbook*. Novosibirsk, Novosibirsk State Agrarian University, 39 p. (in Russian)]

Васильева О.Ю., Дорогина О.В., Кубан И.Н., Сарлаева И.Я., Буглова Л.В. (2018) Методические аспекты изучения биоресурсных коллекций редких и хозяйственно-ценных растений. *Садоводство и виноградарство*, 4: 12–18 [Vasilyeva O. Yu., Dorogina O. V., Kuban I. N., Sarlaeva I. Ya., Buglova L. V. (2018) Methodical aspects of studying of bioresource collections of rare and economic valuable plants. *Horticulture and Viticulture* [Sadovodstvo i vinogradarstvo], 4: 12–18 (in Russian)]

Васильева О.Ю., Сарлаева М.Я. (2021) Создание цифровой семенотеки однолетних декоративных растений. *Вестник КрасГАУ*, 9: 24–29 [Vasilieva O. Yu., Sarlaeva M. Ya. (2021) Creating a digital seed library of annual ornamental plants. *Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University* [Vestnik KrasGAU], 9: 24–29 (in Russian)]

Вишнякова М.А., Гончаров Н.П. (2019) Институциализация генетики и отдалённой гибридизации растений в 1920–1930-е гг. в ВИРе. *Генетика*, 11: 1241–1252 [Vishnyakova M. A., Goncharov N. P. (2019) The institutionalising of genetics and distant hybridization of plants in VIR at the 1920–1930th. *Genetics* [Genetika], 11: 1241–1252 (in Russian)]

Грант В. (1984) *Видообразование растений*. М., Мир, 528 с. [Grant V. (1984) *Plant speciation*. Moscow, Mir, 528 p. (in Russian)]

Губарева Н.К., Гаврилюк И.П., Конарев А.В. (2015) Идентификация сортов сельскохозяйственных культур по электрофоретическим спектрам запасных белков. *Аграрная Россия*, 11: 21–27 [Gubareva N. K., Gavriljuk I. P., Konarev A. V. (2015) Identification of crop varieties by the electrophoretic spectra of reserve proteins. *Agrarian Russia* [Agrarnaya Rossiya], 11: 21–27 (in Russian)]

Доспехов Б.А. (1985) *Методика полевого опыта*. М., Агропромиздат, 351 с. [Dospeskov B. A. (1985) *Field experiment methodology*. M., Agropromizdat, 351 p. (in Russian)]

Дымина Г.Д., Черемушкина В.А. (2003) *Практикум по анатомии и морфологии высших растений*. Новосибирск, Изд. НГПУ, 130 с. [Dymina G.D., Cheremushkina V. A. (2003) *Workshop on anatomy and morphology of higher plants*. Novosibirsk, NSPU, 130 p. (in Russian)]

Есимбекова М.А., Булатова К.М., Кушанова Р.Ж., Мукин К.Б. (2015) Биоразнообразие дикорастущих видов из рода *Aegilops* L. в Казахстане для селекции пшеницы. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 6: 5–18 [Yesimbekova M.A., Bulatova K.M., Kushanova R. Zh., Mukin K. B. (2015) Agrobiodiversity of wheat wild relatives (*Aegilops* L.) in Kazakhstan appropriate for wheat breeding. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy* [Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii], 6: 5–18 (in Russian)]

Конарев А.В. (2002) Адаптивный характер молекулярного полиморфизма и его использование в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции. *Аграрная Россия*, 3: 4–11 [Konarev A. V. (2002) Adaptive nature of molecular polymorphism and its use in solving problems of plant genetic resources and breeding. *Agrarian Russia* [Agrarnaya Rossiya], 3: 4–11 (in Russian)]

Конарев В.Г., Пенева Т.И., Лубо-Лесниченко И. Ф. (1983) Анализ популяций культурной ржи по электрофоретическому спектру глиадина. *Сельскохозяйственная биология*, 1: 43–51 [Konarev V.G., Peneva T.I., Lubo-Lesnichenko I. F. (1983) Analysis of cultivated rye populations by the electrophoretic spectrum of gliadin. *Agricultural Biology* [Sel'skokhozyaistvennaya biologiya], 1: 43–51 (in Russian)]

Красников А.А., Полубоярова Т.В., Шишкин С.В. (2016) *Центр коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ЦСБС СО РАН*. Новосибирск, Академическое изд-во «ГЕО», 47 с. [Krasnikov A. A., Poluboyarova T. V., Shishkin S. V. (2016) *Center for collective use of microscopic analysis of biological objects of the Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*. Novosibirsk, GEO, 47 p. (in Russian)]

Лашин С.А., Афонников Д.А., Генаев М.А., Казанцев Ф.В., Комышев Е.Г., Ощепкова Е.А., Петров А.В., Рассказов Д.А., Смирнова А.А., Колчанов Н.А. (2018) Информационная система по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 22(3): 386–393 [Lashin S. A., Afonnikov D. A., Genaev M. A., Kazantsev F. V., Komyshev E. G., Oschepkova E. A., Petrov A. V., Rasskazov D. A., Smirnova A. A., Kolchanov N. A. (2018) An integrated information system on bioresource collections of the FASO of Russia. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* [Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii], 22(3): 386–393 (in Russian)]

Новикова Т.И. (2013) Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия растений. *Растительный мир Азиатской России*, 2: 119–128 [Novikova T. I. (2013) Use of biotechnological approaches for the conservation of plant biodiversity. *Flora and Vegetation of Asian Russia* [Rastitel'nyi mir Aziatskoi Rossii], 2: 119–128 (in Russian)]

Новикова Т.И., Дорогина О.В. (2010) Сохранение редких и исчезающих видов флоры Сибири методами *ex situ*. *Труды Томского государственного университета. Серия биологическая*, 274: 276–278 [Novikova T.I., Dorogina O. V. (2010) Ex situ conservation of rare and endangered species of Siberian flora. *Proceedings of Tomsk State University. Biological series* [Trudy Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya biologicheskaya], 274: 276–278 (in Russian)]

Осипова Ю.С. (2021) Продуктивность сортообразцов биоресурсной генетической коллекции хмеля обыкновенного в 4-ой закладке на пятый год жизни. *Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства*,

23: 116–119 [Osipova Yu. S. (2021) Productivity of variety samples of the bioresource genetic collection of common hop in the 4th laying in the fifth year of life. *Topical Issues of Improving the Technology of Production and Processing of Agricultural Products* [Aktual'nye voprosy sovershenstvovaniya tekhnologii proizvodstva i pererabotki produktsii sel'skogo khozyaistva], 23: 116–119 (in Russian)]

Сарлаева М. Я., Васильева О. Ю. (2021) Эколого-биологические особенности однолетних декоративных растений при подзимнем посеве в условиях континентального климата. *Самарский научный вестник*, 10(1): 142–150 [Sarlaeva M. Ya., Vasilyeva O. Yu. (2021) Ecological and biological features of annual ornamental plants under pre-winter sowing in a continental climate. *Samara Journal of Science* [Samarskii nauchnyi vestnik], 10(1): 142–150 (in Russian)]

Тарвердян А. П., Меликян А. Ш., Арутюнян М. Г., Оганесян М. Ц. (2013) Результаты использования генофонда диких сородичей зерновых культур Армении как средство для создания новых продуктивных сортов. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, 1: 71–78 [Tarverdyan A. P., Melikyan A. Sh., Harutyunyan M. G., Hovhannisyan M. Ts. (2013) The use of genetic resources of grain crops wild relatives in Armenia as a mean for developing new highly productive varieties. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy* [Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii], 1: 71–78 (in Russian)]

Фомина Т. И. (2012) *Биологические особенности декоративных растений природной флоры в Западной Сибири*. Новосибирск, Академ. Изд-во «ГЕО», 179 с. [Fomina T. I. (2012) *Biological features of ornamental plants of natural flora in Western Siberia*. Novosibirsk, GEO, 179 p. (in Russian)]

Badaeva E. D., Fisenko A. V., Surzhikov S. A., Yankovskaya A. A., Chikida N. N., Zoshchuk S. A., Belousova M. Kh., Dragovich A. Yu. (2019) Genetic heterogeneity of a diploid grass *Aegilops tauschii* revealed by chromosome banding methods and electrophoretic analysis of the seed storage proteins (gliadins). *Russian Journal of Genetics*, 55: 1315–1329

Baum B. R., Yang J.-L., Yen C., Agafonov A. V. (2011) A taxonomic synopsis of the genus *Campeostachys* Drobov. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(2): 146–159

Iriondo J. M., Albert M. J., Escudero A. (2003) Structural equation modelling: an alternative for assessing causal relationships in threatened plant populations. *Biological Conservation*, 113(3): 367–377

Grigoreva E., Ulianich P., Ben C., Gentzbittel L., Potokina E. (2019) First insights into the Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) genome of the ‘Vavilovskij 130’ accession, using second and third-generation sequencing technologies. *Russian Journal of Genetics*, 55: 1406–1416

Heywood V. H., Iriondo J. M. (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation*, 113(3): 321–335

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–685

Pomortsev A. A., Rubanovich A. V., Kovaleva O. N., Lyalina E. V. (2019) Allelic diversity of *Hrd A* and *Hrd B* hordein-coding loci in wild (*Hordeum spontaneum* C. Koch) and cultivated (*Hordeum vulgare* L.) barley from Israel and Palestine. *Russian Journal of Genetics*, 55: 1347–1359

Vasil'eva O. Yu. (2009) Reproduction systems of representatives of the genus *Rosa* L. under conditions of continental climate. *Contemporary Problems of Ecology*, 2(4): 361–368

Volis S., Blecher M. (2010) Quasi *in situ*: a bridge between *ex situ* and *in situ* conservation of plants. *Biodiversity and Conservation*, 19: 2441–2454

EDN: LDJJAK

УДК 581.543:582.734.3(470.21)

Aspects of *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid Development on the Introduction above the Arctic Circle

Olesya E. Zotova* and Oxana A. Goncharova

Polar-Alpine Botanical Garden-Institute
of the Kola Science Center RAS
Apatity, Russian Federation

Received 10.08.2021, received in revised form 18.10.2022, accepted 08.02.2023

Abstract. This study aims to assess the developmental characteristics of *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid on its introduction to the Kola Peninsula. Introduction of new plants aims to offer a range of highly ornamental trees and shrubs for municipal landscaping. Extending lists of highly viable and decorative plants that are suitable for landscaping has always been important. The paper describes the timing of phenological phases, morphometric parameters of inflorescences and fruits, as well as seed propagation under polar conditions. Phenological observations of plants were performed 2–3 times a week during the growing season. Morphometric characteristics of inflorescences were examined during the period of mass flowering of each specimen. The inflorescence density was determined as the ratio of the number of flowers in an inflorescence to its width, the fruit-to-flower ratio was determined as the percentage of full fruit number to the number of buds. A hundred seeds of each specimen were collected, and individual weight of each seed was determined using the analytical balance. Pre-sowing treatment included cold stratification or scarification followed by two-stage stratification. *Crataegus maximowiczii* has a short shoot growth period, short pre-floral period, annual flowering and fruiting. Flowering phases were first observed at the age of 8 years. Flowering and fruiting phases occurred annually; the abundance of flowering and fruiting was given 4–5 points on the five-point V. G. Kapper scale. The pre-floral period was of medium duration and lasted on average for 37 days. Fruit ripening occurred in September. The most stable parameter of the examined specimens was the number of flowers per inflorescence, while the number of fruits and, consequently, the fruit-to-flower ratio were more dependent on external conditions. Morphometric characteristics of inflorescences were species-specific. Average weight samples subjected to combined pre-sowing treatment had the highest germination rate.

© Siberian Federal University. All rights reserved

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

* Corresponding author E-mail address: ol-sha@mail.ru

ORCID: 0000-0003-4986-606X (Zotova O); 0000-0002-8881-8522 (Goncharova O.)

Keywords: phenological phases, flowering, fruit-to-flower ratio, seed weight, pre-sowing treatment, Subarctic.

Acknowledgements. The studies were carried out using the research facility “Collections of Living Plants of the Polar Alpine Botanical Garden and Institute”, reg. No. 499394, within the framework of the research theme “Comprehensive analysis of methods for assessing decorativeness and their applicability to woody plants of the Far North (based on the PABSI collection of introduced woody plants of the KSC RAS)”, state No. registration 1021071612833–7–1.6.11.

Citation: Zotova O. E., Goncharova O. A. Aspects of *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid development on the introduction above the Arctic Circle. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2023, 16(1), 41–53. EDN: LDJJAK.



Особенности развития *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid. при интродукции за Полярным кругом

О. Е. Зотова, О. А. Гончарова
Полярно-альпийский ботанический сад-институт
им. Н. А. Аврорина
Российская Федерация, Анадырь

Аннотация. Данное исследование посвящено оценке развития *Crataegus maximowiczii* при интродукции на Кольский Север. Одной из целей интродукции является разработка ассортимента высокодекоративных деревьев и кустарников для озеленения населенных пунктов. Пополнение списков растений, отличающихся высокой жизнеспособностью и декоративностью и подходящих для использования в озеленении, остается актуальным в настоящее время. В работе представлены сроки наступления фенологических фаз, морфометрические показатели соцветий, плодов, особенности семенного размножения при интродукции в условия Заполярья. Фенологические наблюдения за растениями проводили 2–3 раза в неделю в течение вегетационного сезона. Исследования морфометрических характеристик соцветий проведены в период массового цветения каждого образца. Плотность соцветий определяли как отношение числа цветков в соцветии к его ширине, процент плодоцветения определяли как отношение числа полноценных плодов к числу бутонов. С каждого экземпляра произведен отбор семян и определена индивидуальная масса каждого семени. Предпосевная подготовка проводилась методами холодной стратификации и скарификации с последующей двухэтапной стратификацией. У *Crataegus maximowiczii* короткий период роста побегов, непродолжительный префлоральный период, ежегодное цветение и плодоношение. Фазы цветения впервые отмечены в 8-летнем возрасте. Фазы цветения и плодоношения наблюдаются ежегодно, обилие цветения и плодоношения оценивается по шкале Капера в 4–5 баллов. Префлоральный период средней продолжительности длится в среднем 37 суток. Созревание плодов отмечается в сентябре. Фактор видовой специфики влияет

на морфометрические характеристики соцветий. У исследуемых экземпляров наиболее стабилен показатель количества цветков в соцветии, в то время как количество плодов и, следовательно, показатель плодоцветения в большей степени зависели от внешних условий. Наибольшей всхожестью обладают образцы со средними значениями массы, прошедшие комбинированную предпосевную подготовку.

Ключевые слова: фенологические фазы, цветение / плодоцветение, масса семян, предпосевная подготовка, Субарктика.

Благодарности. Исследования выполнены на базе уникальной научной установки «Коллекции живых растений Полярно-альпийского ботанического сада и института», обл. № 499394, в рамках темы «Комплексный анализ методик оценки декоративности и их применения к древесным растениям Крайнего Севера (на примере коллекции интродуцированных древесных растений ПАБСИ КНЦ РАН)», № гос. регистрации 1021071612833–7–1.6.11.

Цитирование: Зотова, О. Е. Особенности развития *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid. при интродукции за Полярным кругом / О. Е. Зотова, О. А. Гончарова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 41–53. EDN: LDJJAK.

Introduction

Plant introduction is one of the major activities of botanical gardens. Introduction of new plants aims to offer a range of highly ornamental trees and shrubs for municipal landscaping. Since the diversity of the native dendroflora of the Kola Peninsula is limited and the flowering period of woody plants is short, extending lists of highly viable and decorative plants that are suitable for landscaping remains topical. The paper is based on the research conducted at the Polar-Alpine Botanical Garden and Institute on *Crataegus maximowiczii* C. K. Schneid plants introduced to the Kola Peninsula.

Plants of *Crataegus* L. genus are distributed over a large territory in the northern hemisphere. They grow in the temperate and less often in the subtropical zone. Species of *Crataegus* genus are highly decorative during flowering and fruiting periods. For this reason they are widely used in landscaping. Flowering occurs at the age of 10–15 years. The flowering period follows leaf expansion in late May – early June. Complex cymose or umbellate inflorescences

appear on short offshoots of the current year. The hawthorn (*Crataegus*) genus representatives are valuable as medicinal, fruit, and ornamental plants (Poletiko, 1954). On the Kola Peninsula, hawthorns are not found in natural plant communities; they occur as cultivated plants but do not require special care.

The results of introduction of the Rosaceae Juss. family plants in Russia are widely covered in scientific publications. O. V. Skrotskaya and S. A. Miftakhova (2011) presented the results of the Rosaceae family introduction in the Northeast of the European part of Russia. Introduction of the Rosaceae family in Yakutia is described in the papers by N. S. Danilova et al. (2006, 2011). N. A. Kolyada (2009, 2010) addressed the results of introduction of the Rosaceae family North American plants in the Russian Far East. Decorative qualities of the *Crataegus* genus plants were evaluated by S. V. Mukhametova et al. (2013). Some aspects of the *Crataegus* genus plants development and growth on the Kola Peninsula were addressed in the papers published by the staff members of the Polar Alpine Botanical

Garden and Institute (Goncharova et al., 2017; Zotova, Goncharova, 2019).

Recently, particular attention has been given to studying seed propagation of the *Crataegus* genus plants. Researchers have noted that hawthorn seeds remain dormant until favourable conditions occur; their thick endocarps prevent their germination (Vanstone et al., 1982; Nikolaeva, 1979; Vainagii, 1974). According to Nikolaeva et al. (1985), the dormancy of hawthorn seeds is combined: they have deep exogenous and intermediate physiological dormancy. In most cases, scarification or stratification is recommended for disturbing seed dormancy; combination of these methods is also possible (Morgenson, 2000; Bujarska-Borkowska, 2002, 2008).

The research aims to determine the timing of phenological phases, describe morphometric parameters of flowers and fruits and study seed propagation of *C. maximowiczii* on the introduction to polar regions.

Materials and methods

The study was conducted in 2015–2018 based on the collection of introduced tree species in the experimental site of the N. A. Avrorin Polar Alpine Botanical Garden and Institute of the Kola Scientific Center of the Russian Academy of Sciences (PABGI) in Apatity, Murmansk Oblast, Russian Federation. PABGI is one of the few botanical gardens within the Arctic Circle worldwide and the northernmost one in Russia (67°38' N, 33°37' E).

PABGI was founded in 1931 in the framework of the project launched by Professor N. A. Avrorin. The collection of PABGI woody plants is located at its main sites in Kirovsk and Apatity. The woody plants collection in Kirovsk was started with the foundation of PABGI and has been growing ever since. The tree nursery in Apatity was started in 1958. Both sites are located 120

km to the North of the Arctic Circle. The climate of the Murmansk Oblast is Arctic-temperate. The climate of the territory varies considerably. Although it may be severe due to its circumpolar situation, the close proximity to the warm Gulf Stream makes it more favourable. The territory of the PABGI experimental site is located on a piedmont plain, 3 km to the west of Apatity. The average monthly temperature in January–February does not drop below -13 °C; in July it varies from +10 to +14 °C. The first air frosts may be expected in August, the last frosts have been observed in late May and June. Thus, the duration of the frost-free season is about 50–70 days. The maximum precipitation occurs during the summer and autumn months, and minimum precipitation occurs in spring. The mean annual rainfall is 500–600 mm/year. A stable snow cover lasts from 180 to 200 days, the snow cover height being 60–80 cm. The transition of average daily air temperatures through the threshold of +5 °C is observed on 31st May. The growing season is 90–120 days (Semko, 1982).

The object of research, *C. maximowiczii*, is a prickly deciduous shrub or tree up to 7 m high. It is native to Eastern Siberia, Mongolia, northern China, northern Japan, and Korea. It appears at coastal forest strips, forest edges and dry mountain slopes, along roadsides and river banks. *C. maximowiczii* is a very cold-resistant plant, capable of withstanding temperatures up to -25 °C (Huxley et al., 1992). The inflorescences of *C. maximowiczii* are multi-flowered, up to 6 cm in diameter, with densely pubescent pedicels. The flowers are 1.5 cm in diameter, white, turn pink at the edge when they bloom, with an unpleasant smell. The sepals are narrow, triangular, whole-edged, pubescent, bent downwards in mature fruits. The flower has 20 stamens with dark pink anthers and 3–4 pistils. The fruits are red, pubescent, then glabrous, translucent. The flesh of the fruit is orange, powdery, edible, with

3–4 convex bones, smooth on the dorsal side, furrowed and wrinkled on the sides. The plant blooms at the end of May, fruits ripen in early August and remain on the trees until late autumn (Solovyova, Kotelova, 1986).

For the research, 3 specimens of hawthorn *C. maximowiczii* plants were selected. The age of the plants at the time of study was 17–20 years. The plants have grown from seeds of cultural origin obtained from the arboretum of the Institute of Forest and Forest Chemistry in Arkhangelsk, Russian Federation. In the study site, the introduced hawthorn plants are exhibited as a group under similar soil and ground conditions and exposed to specific climate of the Kola subarctic region.

Phenological observations of plants were performed 2–3 times a week during the growing season (Bulygin, 1976; Aleksandrova et al., 1975) in 2015–2018. We recorded the phenophase dates of vegetative buds burst, beginning and end of linear shoot growth, full lignification of annual shoots, leaf budding, completion of leaf growth and ripening, appearance of autumn leaf color, leaf fall, beginning and end of flowering, ripening of fruits. Duration of shoot growth, vegetation, pre-floral period and flowering was estimated (Aleksandrova, Golovkin, 1978). Abundance of flowering and fruiting was evaluated by the V.G. Kapper scale (1930).

Morphometric characteristics of inflorescences were examined in 2018 during mass flowering of each specimen. Ten inflorescences per plant were randomly selected from the middle part of the crown. The inflorescence and flower sizes were determined by the largest diameter using a ruler with a measurement accuracy of 0.1 cm. The inflorescence density was determined as the ratio of the number of flowers in an inflorescence to its width (Mukhametova et al., 2013). The fruit-to-flower ratio was determined as the percentage of full fruit number to the

number of buds (Vainagii, 1974). Fruits (100–150 pcs) were harvested in different parts of the crown during their full ripening in September 2017. The fruit size was measured using a caliper to the nearest 0.1 mm.

Seeds were harvested in August-September for three years (2015–2017). A hundred seeds were collected from each specimen, and the individual weight of each seed was determined using the analytical balance VLR-200 to the nearest 0.0001 g. Seeds were grouped into classes according to their weight using the variation statistics methods (Dospelkhov, 1985).

Pre-sowing treatment included (I) cold stratification or (II) scarification followed by two-stage stratification.

The 2015 harvest seeds were subjected to cold stratification, which stimulates seed germination from the state of the deepest dormancy (Nikolaeva, 1979). Seeds were preliminarily washed in running water for three days, then kept in plastic containers in a refrigerator at a temperature of 4–6 °C from 1st March to 12th May, 2016. The stratification medium included fibric high-moor peat with addition of sapric peat, pH 5.59–6.50, nitrogen ($\text{NH}_4 + \text{NO}_3$) – no less than 200 mg/l, phosphorus (P_2O_5) – no less than 200 mg/l, potassium (K_2O) – no less than 250 mg/l. Control samples of seeds in the same substrate were kept in a dark room at a temperature of 22–25 °C, for the same period from 1st March to 12th May, 2016.

The 2016 harvest seeds underwent combined pre-sowing treatment (scarification followed by two-stage stratification). This technique stimulates seed germination from the state of combined dormancy (Crocker, 1948). Seeds were soaked in a concentrated solution of sulfuric acid (H_2SO_4) for 60 minutes and washed under running water for three minutes, then subjected to two-stage stratification. High-moor peat was also used as a stratification medium. At the first stage, seeds were kept in a dark room at 22–25 °C from

3rd January to 1st March, 2017. At the second stage of stratification, seeds were kept in a refrigerator at 4–6 °C from 1st March to 18th June, 2017.

Stratified seeds of the 2015 harvest were sowed on 12th May, 2016. Scarified and stratified seeds of the 2016 harvest were sowed on 18th June, 2017. Stratified, scarified and control seeds were germinated in soil in sowing boxes in an open greenhouse. Soil composition for germination included peat, sand, limestone flour, expanded clay drainage, pH – 5.9–6.5, nitrogen ($\text{NH}_4 + \text{NO}_3$) – 325 mg/kg, phosphorus (P_2O_5) – 370 mg/kg, potassium (K_2O) – 500 mg/kg.

Statistical parameters were calculated using the Microsoft Excel application following standard methods (Ivanter, Korosov, 2003; Korosov, Gorbach, 2010).

Results and discussion

In the subarctic climate of the Kola Peninsula, the examined *C. maximowiczii* plants retained their habitus, had a well-formed trunk and branches, and showed yearly lignification of annual shoots, average shoot-forming ability and annual growth in height; also, self-seeding was observed.

Table 1 shows phenological observations of the plant vegetative organs in 2015–2018. They are compared with long-term average annual data (2001–2015) published earlier (Goncharova et al., 2017).

During 2015–2018, the vegetation onset of *C. maximowiczii* was observed during late April to late May. Appearance of autumn leaf color was observed from the end of August to the middle of September (according to the long-term observations, the average annual date is 3rd September). In 2016, the growing season was longer due to the earlier start. In general, our observations allow to classify *C. maximowiczii* as a plant with an early onset and short growing season according to Aleksandrova-Golovkin scale (1978).

Plants enter the phase of linear shoot growth from the middle of May to the middle of June. Before the end of the growing season, shoot linear growth and lignification of the observed specimen normally come to an end. By linear shoot growth duration, *C. maximowiczii* can be classified as a plant with a short period of shoot growth.

The timing of flowering and fruiting phenophases is shown in Table 2. The flowering phase was first observed at the age of 8 years. The phases of flowering and fruiting were observed every year; the abundance of flowering and fruiting was given 4–5 points on the five-point V.G. Kapper scale. Pre-floral period was of medium duration and lasted on average for 37 days. Fruit ripening was observed in September.

The timing of the phenological phases varies from year to year, which is explained by

Table 1. The timing of the onset of vegetative phenological phases in *C. maximowiczii* in 2015–2018

Years	Phenological phases								Dg, day	VP, day
	Vb 2	Gs 1	Gs 2	Lig 2	L 1	L 3	L 4	L 5		
2015	8.V	29.V	6.VII	31.VII	25.V	22.VI	1.IX	28.IX	38	116
2016	30.IV	18.V	20.VI	1.VIII	5.V	17.VI	6.IX	25.IX	33	129
2017	25.V	14.VI	2.VIII	21.VIII	8.VI	10.VII	15.IX	20.VII	49	113
2018	10.V	21.V	5.VII	18.VIII	19.V	22.VI	28.VIII	27.IX	45	110
2001–2015*	18.V	30.V	20.VII	6.VIII	25.V	23.VI	3.IX	1.X	51	108

Vb 2 – vegetative buds burst, Gs 1 / Gs 2 – beginning and end of linear shoot growth, Lig 2 – full lignification of annual shoots, L 1 – leaf budding, L 3 – completion of leaf growth and ripening, L 4 – appearance of autumn leaf color, L 5 – leaf fall; Dg – duration of shoot growth, VP – growing season. * Data from (Goncharova et al., 2017).

Table 2. The timing of the onset of the phenological phases of flowering and fruiting in *C. maximowiczii* in 2015–2018

Years	Phenological phases			PFP, day / DF, day
	Fl4	Fl5	Fr3	
2015	26.VI	10.VII	17.IX	49/14
2016	14.VI	24.VI	23.VIII	45/10
2017	15.VII	20.VII	22.IX	51/5
2018	20.VI	30.VI	8.IX	41/10
2001–2015*	24.VI	1.VII	1.IX	37/7

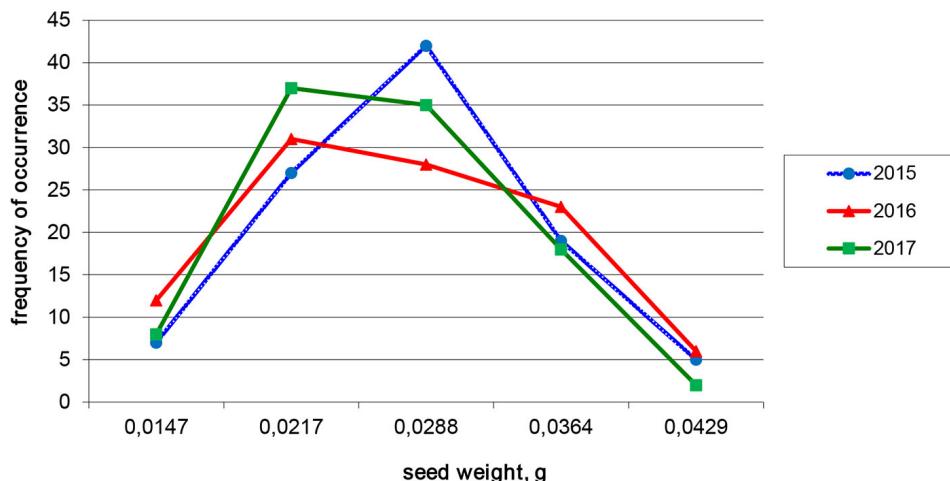
Fl4 / Fl5 – beginning and end of flowering, Fr 3 – ripening of fruits, PFP – pre-floral period, DF – duration of flowering. * Data from (Goncharova et al., 2017).

the weather conditions of the growing season. The closest to the average long-term data are the phenophases of 2018 (Table 2).

Seed weight distribution was obtained using the methods of variation statistics. Individual seed weight distribution curves of the 2015–2017 harvest are shown in Fig. 1. Approximation of variants to the symmetric normal distribution curve was noted in 2015. In other years, asymmetric distribution of individual seed weight was common. A shift towards the smallest weights was observed, which could be due to the least favourable factors of the growing season.

The individual seed weight distribution curves of individual specimens in 2017 are shown in Fig. 2. *C. maximowiczii* plants under examination differed in seed weight values. The smallest values of seed weight were noted for specimen 1, the highest ones for specimens 2 and 3. Hence, distribution of variants of specimen 1 shifted from the average toward the smallest value. Since all specimens were subjected to an identical set of environmental factors, the effect of endogenous factors on the studied parameter seems unclear.

According to the observations, no seeds germinated during the first year, which corresponds

Fig. 1. Distribution of seed weight of *C. maximowiczii* in 2015, 2016, and 2017, total of 100 seeds collected from each of the three examined specimens

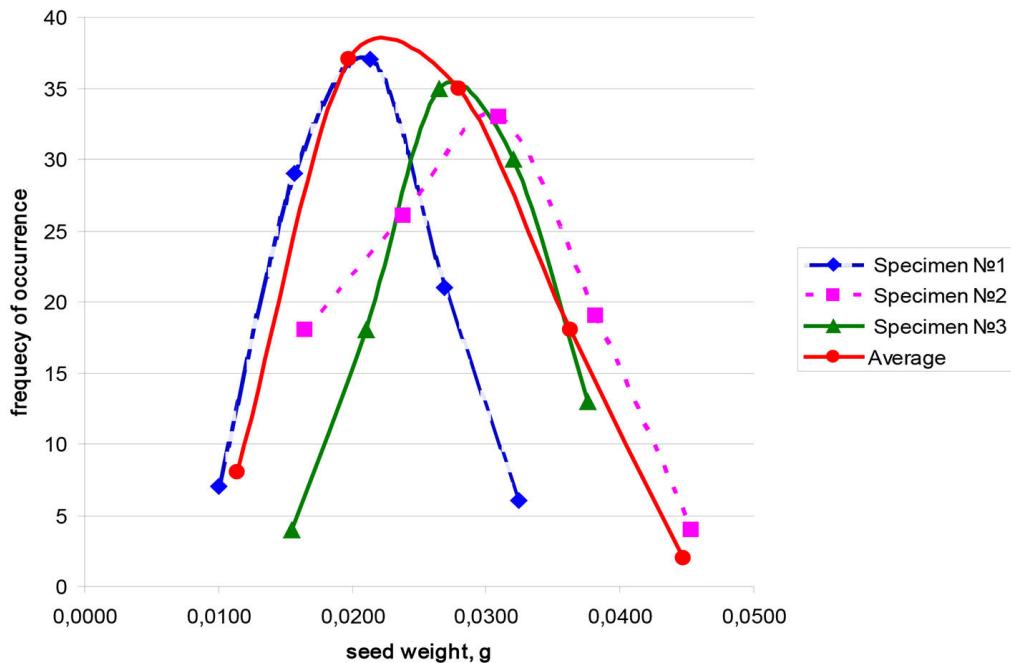


Fig. 2. Distribution of seed weight of individual *C. maximowiczii* plants in 2017

to the referenced data that seedlings appear on the second or the third year (Nikolaeva, 1979; Tyszkiewicz, 1949). The absence of germination under favourable conditions can be accounted for by organic dormancy of the seeds themselves.

The observations continued during the growing seasons of 2017–2018. Seedlings from all samples subjected to a variety of pre-sowing treatments were obtained within the period from June 14 to 30, 2017–2018. Field germination of the studied species was estimated as a percentage of the number of seedlings out of the number of seeds sown. Field germination was estimated for each weight class.

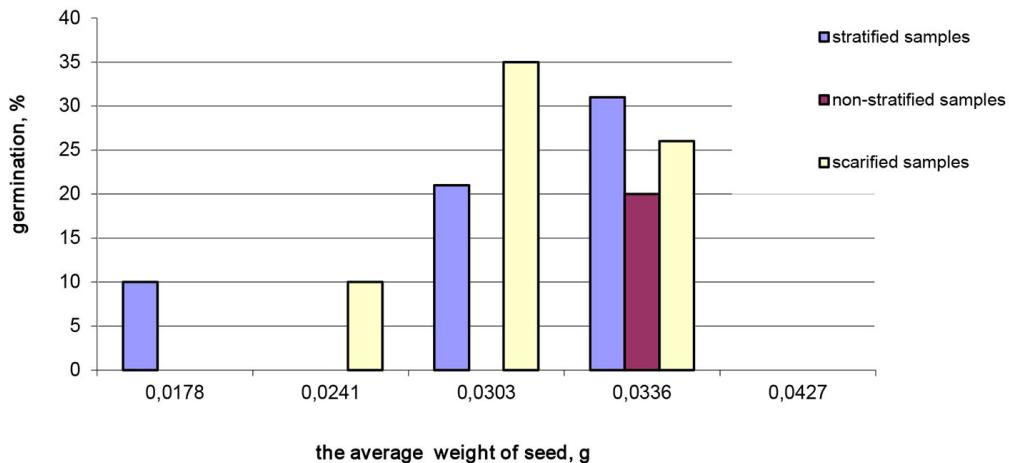
The highest germination of *C. maximowiczii* seeds amounted to 35 % and was observed for seeds with an average weight of 0.0303 g subjected to a combined pre-sowing treatment. For stratified samples with an average weight of 0.0336 g, the germination equaled 31 %. Samples with the highest seed weights (0.0427 g) did not germinate; the germination rate of

low-weight seeds (0.0178 and 0.0241 g) was negligible, regardless of pre-sowing treatment. Germination of samples that did not undergo pre-sowing treatment was observed only in seeds of the fourth class (0.0336 g) and amounted to 20 % (Fig. 3).

An analysis of field germination dependence on individual seed weight of the *C. maximowiczii* representatives revealed that the germination rate depended on pre-sowing treatment and seed weight. Samples with average weight values that underwent combined pre-sowing treatment had the highest germination ability.

A similar positive effect of the two-stage pre-sowing treatment (a combination of acid scarification and cold stratification) on germination of some *Crataegus* species was noted by Morgenson G. (2000), Bujarska-Borkowska B. (2002, 2008). A positive effect of warm and cold stratification was also noted (Nyholm, 1975).

At the next stage, the degree of flowering and fruiting of *C. maximowiczii* plants was evaluated

Fig. 3. Germination of *C. maximowiczii* seeds of different weightTable 3. Morphometric parameters of *C. maximowiczii* flowers and inflorescences on the introduction in 2018

Instance	Inflorescence diameter, cm	Flower diameter, cm	Number of flowers in the inflorescence, pcs.	Inflorescence density, pcs./cm
1	6.63±0.30	1.62±0.05	28.00±1.43	4.23±0.21
2	4.96±0.27	1.37±0.05	21.45±1.34	4.50±0.42
3	6.37±0.30	0.52±0.05	33.40±2.23	5.37±0.47
Mean	5.95±0.21	1.50±0.03	27.42±1.29	4.69±0.23

(Table 3). These important indicators determine seed propagation under new conditions.

The examined *C. maximowiczii* specimens differed in morphometric parameters of flowers and inflorescences. The smallest inflorescence width was observed in specimen 2, the maximum width in specimen 1. The average inflorescence width of the studied plants was 5.95 ± 0.21 cm. The minimum diameter of flowers was observed in specimen 3 (0.52 cm), the maximum width in specimen 1 (1.62 cm). The average flower width was 1.5 ± 0.03 cm.

Specimens 3 and 1 had the largest number of flowers. The density of inflorescences was the highest (5.37 pcs/cm) in specimen 3, specimen 1 had lower density inflorescences (4.23 pcs/cm). Specimen 2 had the smallest number of flowers in an inflorescence and the smallest

diameter of inflorescences. The average density of inflorescences was 4.69 ± 0.23 pcs/cm.

A correlation analysis showed a positive relationship between the average number of flowers and inflorescence density ($r = 0.65$ at $\alpha = 0.001$) and between the sizes of inflorescences and flowers ($r = 0.64$ at $\alpha = 0.001$). It means that, specimens with denser inflorescences are characterized by larger numbers of flowers in the inflorescence. Samples with small flower size form small inflorescences and vice versa. No reliable correlation between the inflorescence density and flower size, between the width of inflorescences and their density and between the size of flowers and their number was revealed.

We have previously studied morphometric parameters that determine the decorative qualities of flowers and inflorescences, i.e. the

number of flowers in the inflorescence, the diameter of flowers, the diameter and density of inflorescences, in *C. maximoviczii*, *C. dahurica*, *C. sanguinea*, *C. laevigata*, *C. flabellata* (Zotova, Goncharova, 2019). It was shown that *Crataegus* species are most decorative during flowering. *C. maximowiczii* and *C. dahurica* have the largest flowers and inflorescences. The dependence of morphometric characteristics of inflorescences on species affiliation was studied using the single-factor analysis of variance. The factor of species affiliation affects the morphometric characteristics of inflorescences. A single-factor analysis of variance showed that the species affiliation contributed 63 %, 47 %, 31 % and 23 % to the variance of the number of flowers in inflorescence, inflorescence width, flower diameter and inflorescence density, respectively. Under the subarctic conditions of the Kola Peninsula, the number of flowers in inflorescences largely depends on species affiliation, whereas other studied parameters are less affected by it. Based on these observations, *C. maximowiczii* is recommended for use in landscaping of northern cities as a species with highly decorative large inflorescences.

In the environment of the Kola Peninsula, *C. maximowiczii* plants bear fruits of regular shape without significant damage. The fruit-to-flower ratio in *C. maximowiczii* plants on introduction over a three-year period (2016–2018) showed stability, the deviation from the average value in different years was $\pm 6.7\%$ (Fig. 4). The most stable parameter of the studied specimens was the number of flowers in an inflorescence, while the number of fruits and, consequently, the fruit-to-flower ratio were more dependent on external conditions. Morphometric parameters of the *C. maximowiczii* fruits on the introduction are shown in Table 4.

Notwithstanding homogeneous soil and climate conditions, the specimens showed varying fruit-to-flower ratios and fruit diameters (Table 4). The average fruit diameter of specimens 2 and 3 (9.7 ± 0.2 and 9.9 ± 0.2 mm, respectively) was close to the average values of 10.0 mm (Solovyova, Kotelova, 1986). The variation factor for the fruit size was 14.71 %, which corresponds with low variability level of this parameter by the S. A. Mamaev scale (1972). Hence, under the conditions of introduction to the Kola subarctic region, *C. maximowiczii* plants

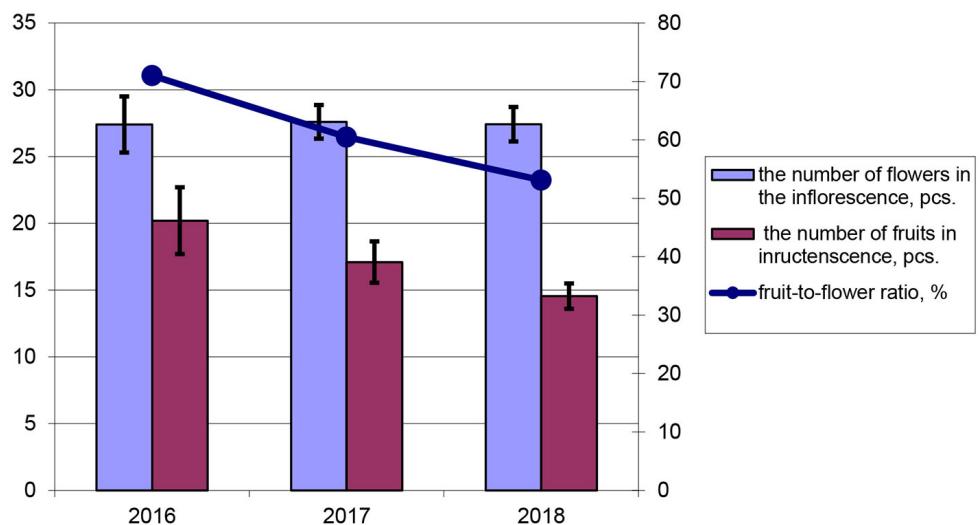


Fig. 4. Fruit-to-flower ratio of *C. maximowiczii* plants in 2016–2018

Table 4. Morphometric parameters of *C. maximowiczii* fruits and the fruit-to-flower ratio on the introduction in 2018

Instance	The number of fruits in infructescence, pcs.	Diameter of fruits, mm	Fruit-to-flower ratio, %
1	19.80±1.41	12.5±0.2	70.7
2	12.45±1.37	9.7±0.2	58.1
3	11.60±0.83	9.9±0.2	34.7
Mean	14.55±0.95	10.7±0.2	53.1

can be classified as small-fruited; the size of fruits is determined not only by species affiliation but varies phenotypically within the species.

Conclusion

Phenological development of *C. maximowiczii* is determined by environmental conditions of the Kola Peninsula, these plants complete a full development cycle, are winter-resistant and viable. *C. maximowiczii* has a short growing

season with an early start. The average duration of the growing season is 108 days. Plants enter the generative stage of ontogenesis at the age of 8 years. The phases of flowering and fruiting are observed annually. A short pre-floral period provides enough time for seed ripening. To stimulate seed germination, a combined pre-sowing preparation is recommended: thermal and cold stratification, acid scarification and cold stratification.

References

- Aleksandrova M. S., Bulygin N. E., Voroshilov V. N. (1975) *Guidelines on phenological observation in the botanical gardens of the USSR*. Moscow, Main Botanical Garden USSR, 28 p. (in Russian)
- Aleksandrova N. M., Golovkin B. N. (1978) *Introduction of trees and shrubs to the Far North*. Leningrad, Nauka, 116 p. (in Russian)
- Bujarska-Borkowska B. (2002) Breaking of seed dormancy, germination and seedling emergence of the common hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.). *Dendrobiology*, 47: 61–70
- Bujarska-Borkowska B. (2008) Seed dormancy breaking in *Crataegus pedicellata*. *Dendrobiology*, 60: 51–56
- Bulygin N. E. (1976) *Dendrology. Phenological observation of deciduous woody plants*. Leningrad, Forest Technical Academy, 70 p. (in Russian)
- Crocker W. (1948) *Growth of plants*. New York, Reinhold Publishing Corporation
- Danilova N. S., Rogozhina T. Yu., Romanova A. Yu., Borisova S. Z., Ivanova N. S. (2011) Introduction stability of plants is a basic of working out of ornamental plants assortment for towns of the Central Yakutia. *Bulletin of Irkutsk State University. Series “Biology. Ecology”* [Izvestiia Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriia «Biologija. Ekologija»], 4(2): 17–22 (in Russian)
- Danilova N. S., Romanova A. Yu., Rogozhina T. Yu. (2006) Methods of selection of introduced species for Central Yakutia. *Bulletin of Yakutsk State University* [Vestnik Iakutskogo gosudarstvennogo universiteta], 3(4): 14–21 (in Russian)
- Dospelkov B. A. (1985) *Field experiment methodology (with the basics of statistical research results processing)*. Moscow, Agropromizdat, 351 p. (in Russian)

- Goncharova O. A., Poloskova E. Yu., Zotova O. E., Lipponen I. N. (2017) Introduction of *Crataegus* L. samples in the Kola North. *Samara Journal of Science* [Samarskii nauchnyi vestnik], 6(2): 31–35 (in Russian)
- Huxley A. J., Griffiths M., Levy M. (1992) *The new RHS dictionary of gardening*. London, MacMillan Press
- Ivanter E. V., Korosov A. V. (2003) *Introduction to quantitative biology: textbook*. Petrozavodsk, Petrozavodsk Statet University, 304 p. (in Russian)
- Kapper V. G. (1930) On the organization of annual systematic observations of tree species fruiting. *Papers on forest experimental work. Issue 8*. Leningrad, State Institute of Forestry, p. 103–139 (in Russian)
- Kolyada N. A. (2009) Results of introduction of North-American species of family Rosaceae in the conditions of the south of Primorye Territory. *Bulletin of the Botanical Garden-Institute FEB RAS* [Bulleton' Botanicheskogo sada-instituta DVO RAN], 3: 87–90 (in Russian)
- Kolyada N. A. (2010) Botanical and geographical analysis of the collection of North American species of Rosaceae Juss. family introduced at the arboretum of mountain-taiga station of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Geography. Geoecology* [Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriia: Geografija. Geoekologija], 2: 57–59 (in Russian)
- Korosov A. V., Gorbach V. V. (2010) *Computer processing of biological data: a handbook of methodology*. Petrozavodsk, Petrozavodsk State University, 84 p. (in Russian)
- Mamaev S. A. (1972) *Intraspecific variation of woody plants (in Pinaceae family of the Urals)*. Moscow, Nauka, 284 p. (in Russian)
- Morgenson G. (2000) Effects of cold stratification, warm-cold stratification, and acid scarification on seed germination of 3 *Crataegus* species. *Tree Planters' Notes*, 49(3): 72–74
- Mukhametova S. V., Grigoryeva K. Yu., Faizullina G. M. (2013) Ornamental qualities of hawthorn inflorescences and flowers. *Subtropical and Ornamental Horticulture* [Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo], 49: 122–127 (in Russian)
- Nikolaeva M. G. (1979) *Accelerated germination of dormant seeds of woody plants*. Leningrad, Nauka, 80 p. (in Russian)
- Nikolaeva M. G., Razumova M. V., Gladkova V. N. (1985) *Handbook on germination of dormant seeds*. Leningrad, Nauka, Leningrad Branch, 348 p. (in Russian)
- Nyholm J. (1975) Germination of tree seeds. Dormancy. *Acta Horticulture*, 54: 21–24
- Poletiko O. M. (1954) Hawthorn-*Crataegus* L. *Trees and shrubs of the USSR. Vol. 3*. Moscow, Leningrad, USSR Academy of Sciences, p. 514–577 (in Russian)
- Semko A. P. (1982) *Hydrothermal soil regime of the forest zone of the Kola Peninsula*. Apatity, Kola Branch of USSR Academy of Science, 142 p. (in Russian)
- Skrotskaya O. V., Miftakhova S. A. (2011) Some kinds of the family Rosaceae Juss.: introduction and prospects of cultivation in the north. *Bulletin of the Irkutsk State Agricultural Academy* [Vestnik IrGSKhA], 44: 122–130 (in Russian)
- Solovyova N. M., Kotelova N. V. (1986) *The Hawthorn*. Moscow, Agropromizdat, 72 p. (in Russian)
- Tyszkiewicz S. (1949) *The forest seeds*. Warsaw, Forest Research Institute

Vainagii I. V. (1974) On the techniques of seed productivity research. *Botanical Journal* [Botanicheskii zhurnal], 59(6): 826–831 (in Russian)

Vanstone D. E., Ronald W. G., Marshall H. H. (1982) *Nursery propagation of woody and herbaceous perennials for the Prairie Provinces*. Ottawa, Agriculture Canada

Zotova O. E., Goncharova O. A. (2019) Morphometric characteristics of inflorescences and phenology of introduced plants of the genus *Crataegus* L. in the Kola subarctic conditions. *Samara Journal of Science* [Samarskii nauchnyi vestnik], 8(3): 42–46 (in Russian)

EDN: NVSQPN

УДК 581.1:633.11/1.13

The Effects of Different Concentrations of Salicylic and Succinic Acids on the Germination and Morphometric Parameters of Oat *Avena sativa* L. and Wheat *Triticum durum* L.

Anastasia V. Yakunina* and Yulia V. Sinitina

National Research Lobachevsky State University

of Nizhny Novgorod

Nizhny Novgorod, Russian Federation

Received 14.12.2021, received in revised form 16.07.2022, accepted 15.10.2022

Abstract. The use of growth regulators is an encouraging trend in plant physiology. The most promising approach in agriculture is the application of artificial analogs of plant growth regulators, which are used in small amounts and are harmless to humans and the environment. These compounds include substances based on plant hormones and their mimetics. The purpose of the current research was to study the effect of pre-sowing treatment of oat and wheat seeds with solutions of salicylic and succinic acids at concentrations of 0.5 mM, 0.05 mM, and 0.005 mM on germination and morphometric parameters of plants. The germination energy was determined on Day 4, the germination capacity on Day 7, and the lengths of the roots and shoots, the area of the second leaf, and the wet and dry weights of shoots and roots on Day 14 of the growing period. The study showed that the pre-sowing treatment of oat plants with salicylic acid at a concentration of 0.005 mM increased germination by 75 %. At a higher concentration, 0.05 mM, salicylic acid increased the oat root length by 36 % and the shoot wet and dry weights by 45 % and 56 %, respectively. Succinic acid at a concentration of 0.5 mM reduced the germination energy of oat seeds by 40 %, but at a lower concentration, 0.005 mM, increased germination energy by 56 % and germination capacity by 53 %. The pre-sowing treatment of wheat seeds showed that salicylic acid at a concentration of 0.5 mM reduced the root wet weight by 59 %. Succinic acid at the same concentration led to an increase in wet and dry weights of wheat shoots by 30 % and 48 %, respectively. Lower concentrations of salicylic and succinic acids should be used to increase germination. However, to increase the size or mass of plant seedlings, these compounds should be used at higher concentrations (0.05–0.5 mM). Salicylic acid was generally more beneficial for oat plants, while succinic acid produced more favorable effects on wheat plants.

© Siberian Federal University. All rights reserved

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

* Corresponding author E-mail address: yakunina.anastasia@gmail.com
ORCID: 0000-0003-0462-3793 (Yakunina A.); 0000-0003-1127-363X (Sinitina Yu.)

Thus, pre-sowing treatment of seeds with salicylic and succinic acids can be considered as a method for improving plant growth.

Keywords: salicylic acid, succinic acid, oat, wheat, morphometry.

Citation: Yakunina A. V., Sinitcina Yu. V. The effects of different concentrations of salicylic and succinic acids on the germination and morphometric parameters of oat *Avena sativa* L. and wheat *Triticum durum* L. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2023, 16(1), 54–63. EDN: NVSQPN.



Влияние салициловой и янтарной кислот разных концентраций на всхожесть и морфометрические показатели растений овса посевного *Avena sativa* L. и пшеницы твёрдой *Triticum durum* L.

А. В. Якунина, Ю. В. Синицына

*Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет имени Н. И. Лобачевского
Российская Федерация, Нижний Новгород*

Аннотация. Использование регуляторов роста – перспективное направление в физиологии растений. Наиболее перспективен поиск нового поколения химических регуляторов роста – аналогов природных соединений, применяемых в микродозах, безвредных для человека и окружающей среды. К таким соединениям можно отнести вещества на основе фитогормонов и их миметиков. Целью работы было изучить влияние предпосевной обработки семян овса и пшеницы растворами салициловой и янтарной кислот концентраций 0,5 mM, 0,05 mM и 0,005 mM на всхожесть и морфометрические показатели растений. Определяли энергию прорастания на 4 сутки, всхожесть на 7 сутки, длину корня и побега, площадь второго листа, сырой и сухой вес на 14 день вегетации. Установлено, что предпосевная обработка растений овса салициловой кислотой в концентрации 0,005 mM повышала всхожесть на 75 %. В более высокой концентрации 0,05 mM салициловая кислота увеличивала длину корня овса на 36 % и повышала сырой и сухой вес побега на 45 % и 56 % соответственно. Янтарная кислота в концентрации 0,5 mM снижала энергию прорастания семян овса на 40 %, а в более низкой концентрации 0,005 mM – увеличивала этот показатель на 56 % и повышала всхожесть на 53 %. Предпосевная обработка семян пшеницы показала, что салициловая кислота в концентрации 0,5 mM снижала сырой вес корня на 59 %. Янтарная кислота в той же концентрации приводила к увеличению сырого и сухого веса побега пшеницы на 30 % и 48 % соответственно. Чтобы повысить всхожесть предпочтительнее использовать низкие концентрации салициловой и янтарной кислот, однако для увеличения размеров или массы проростков растений рекомендуется использовать более высокие концентрации 0,05–0,5 mM. На растения овса положительное действие чаще оказывала

салициловая кислота, на растения пшеницы – янтарная. Таким образом, предпосевная обработка семян растворами салициловой и янтарной кислот может рассматриваться в качестве метода улучшения роста растений.

Ключевые слова: салициловая кислота, янтарная кислота, овёс посевной, пшеница твёрдая, морфометрия.

Цитирование: Якунина, А. В. Влияние салициловой и янтарной кислот разных концентраций на всхожесть и морфометрические показатели растений овса посевного *Avena sativa* L. и пшеницы твёрдой *Triticum durum* L. / А. В. Якунина, Ю. В. Синицына // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 54–63. EDN: NVSQPN.

Введение

В настоящее время ведётся активный поиск препаратов, стимулирующих рост и развитие растений и в то же время являющихся безопасными для здоровья человека и окружающей среды. К таким препаратам можно отнести регуляторы роста на основе природных соединений и фитогормонов. Салициловая кислота (СК) относится к фитогормонам, которые обеспечивают растению устойчивость к повреждению различными патогенами. Салициловая кислота в микромолярных концентрациях обнаружена в листьях, корнях, цветках и плодах многих растений (Raskin, 1992). При участии салициловой кислоты происходит доставка новообразованных белков в ядро, хлоропласты, митохондрии и вакуоли (Тарчевский, 2002). Синтез салициловой кислоты играет ключевую роль в реакции сверхчувствительности, а также в пролонгированной системной устойчивости растений к широкому кругу инфекций (Vasyukova, Ozeretskaya, 2007). Специфической особенностью этого фитогормона является его способность активировать цианид-устойчивое дыхание растений, приводящее к выделению тепла (Vlot et al., 2009). Салициловая кислота вызывает закрытие устьиц наряду с абсцизовой кислотой, участвует в сигнальной регуляции генной экспрессии в ходе старения листьев арабидопсиса (Prodhan et

al., 2018). Салициловая кислота может снижать степень повреждающего действия ионов тяжелых металлов на растения риса (Байбурина, Фазлутдинова, 2015).

Органические кислоты как продукты метаболизма растений могут выступать в качестве регуляторов роста растений, поэтому представляет интерес изучение их рострегулирующего действия. Янтарная кислота (ЯК) является природным миметиком салициловой кислоты (Тарчевский и др., 1999). Существенное преимущество применения янтарной кислоты в растениеводстве перед другими биостимуляторами состоит в том, что при весьма незначительных применяющихся для обработки дозах экзогенной янтарной кислоты ее можно получать в больших количествах недорогим способом. Янтарная кислота, являясь природным соединением, может быстро метаболизироваться растением или разрушаться микрофлорой, что обуславливает отсутствие её остаточных количеств в продуктах и средах. Поэтому дальнейшее изучение применения янтарной кислоты в качестве биостимулятора и адаптогена растений является весьма перспективным направлением, как с экологической, так и с экономической точки зрения (Грабовская и др., 2020).

Целью работы было изучение влияния предпосевной обработки семян овса и пшеницы

ницы растворами салициловой и янтарной кислот концентраций 0,5 мМ, 0,05 мМ и 0,005 мМ на энергию прорастания, всхожесть семян, длину побега и корня, площадь второго листа, сырой и сухой вес побегов и корней.

Материалы и методы

Растения овса посевного (*Avena sativa* L.) сорта Кречет и растения пшеницы твёрдой (*Triticum durum* L.) сорта Харьковская 46 выращивали в лабораторных условиях. Семена предварительно промывали водой с мылом и обрабатывали 3 % раствором перекиси водорода. Семена растений были разделены на следующие экспериментальные группы: первую группу семян замачивали в дистиллированной воде (контроль); вторую – в растворе 0,5 мМ салициловой кислоты; третью – в растворе 0,05 мМ салициловой кислоты; четвёртую – в растворе 0,005 мМ салициловой кислоты. Пятую, шестую и седьмую группы замачивали в растворах янтарной кислоты 0,5 мМ, 0,05 мМ и 0,005 мМ концентраций соответственно. Время замачивания семян составляло 16 часов. После замачивания семена промывали дистиллированной водой и переносили в чашки Петри для определения энергии прорастания и всхожести.

Определение лабораторной всхожести семян и энергии прорастания проводили согласно ГОСТу 12038–84. Для этого отбирали из фракции семян четыре пробы по 100 семян в каждой. Семена прорашивали в чашках Петри в темноте при температуре 22–24 °С, в качестве подстилки применяли фильтровальную бумагу. Бумагу увлажняли до полной влагоёмкости (опускали в воду, затем давали стечь избытку воды). За прорастанием семян наблюдали ежедневно в течение 7 суток. Количество семян, проросших на 4 сутки, определяли как энергию прорастания, количество проростков на 7 сутки – как всхожесть. Всхож-

есть и энергию прорастания семян вычисляли как среднее арифметическое результатов анализа четырех проб и выражали в процентах (Беляев, 2000).

После появления первых корешков на 4 сутки проросшие семена переносили в вегетационный сосуд на 200 мл, на один сосуд сажали 5 семян овса или пшеницы. Вегетационные сосуды предварительно заполняли грунтом, имеющим в своём составе смесь торфов различной степени разложения, комплексное минеральное удобрение, песок речной термически обработанный, муку известняковую (доломитовую). Массовая доля питательных веществ грунта для азота (N) – 250 мг/л; фосфора (P₂O₅) – 275 мг/л; калия (K₂O) – 275 мг/л. pH солевой вытяжки – 8,25. Растения овса и пшеницы выращивали при естественном освещении и температуре 24–26 °С. Полив осуществляли каждый день. Через две недели определяли морфометрические параметры: длину корня, длину побега, площадь второго листа. Также регистрировали сырой и сухой вес побегов и корней. Рассчитывали среднее значение, ошибку среднего. Статистическую значимость различий определяли по коэффициенту Стьюдента. Минимальное количество измерений каждого показателя для каждой группы – 5 (Гланц, 1998).

Результаты и обсуждение

Определение лабораторной всхожести – один из важнейших видов оценки посевных качеств семян, так как при плохой всхожести получаются изреженные посевы, что снижает урожай. Выраженность эффекта от обработки семян растений овса зависела от вида использованного регулятора роста (табл. 1). Салициловая кислота в целом не влияла на энергию прорастания, но в самой низкой концентрации (0,005 мМ) увеличила всхожесть на 75 %. В отличие от салициловой кислоты янтарная

Таблица 1. Влияние салициловой (СК) и янтарной (ЯК) кислот на энергию прорастания и всхожесть растений овса

Table 1. The effects of salicylic (CK) and succinic (ЯК) acids on the germination energy and germination rate of oat plants

Вариант опыта	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	11,5 ± 1,8	17,0 ± 2,1
Обработка СК 0,5 мМ	14,8 ± 1,8	20,8 ± 1,7
Обработка СК 0,05 мМ	15,3 ± 1,7	23,5 ± 3,5
Обработка СК 0,005 мМ	16,8 ± 1,7	29,8 ± 4,5*
Обработка ЯК 0,5 мМ	7,0 ± 0,7*	11,3 ± 1,4
Обработка ЯК 0,05 мМ	14,3 ± 3,2	20,8 ± 4,6
Обработка ЯК 0,005 мМ	18,0 ± 1,5*	26,0 ± 3,2*

*- различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$

кислота имела более выраженный эффект на энергию прорастания: в низкой концентрации (0,005 мМ) увеличивала этот показатель на 56 %, а в высокой – 0,5 мМ наоборот снижала его на 40 %. Также янтарная кислота в концентрации 0,005 мМ повышала всхожесть овса на 53 %.

На энергию прорастания и всхожесть семян пшеницы обработка салициловой и янтарной кислотами не повлияла, только янтарная кислота в концентрации 0,5 мМ незначительно снижала энергию прорастания семян на 3 % (табл. 2). Пшеница изначально

имела высокую степень всхожести (96 %), поэтому обработка исследуемыми органическими кислотами не улучшила данный показатель, однако и не снизила его. В отличие от пшеницы, овёс прорастал медленно, поэтому на 4 и 7 сутки регистрации получены довольно низкие показатели энергии прорастания и всхожести. Вероятно, именно медленно прорастающие культуры наиболее чувствительны к применению регуляторов роста, но эффект зависит от концентрации.

Результаты проведённого эксперимента сопоставимы с данными других исследова-

Таблица 2. Влияние салициловой и янтарной кислот на энергию прорастания и всхожесть растений пшеницы

Table 2. The effects of salicylic and succinic acids on the germination energy and germination rate of wheat plants

Вариант опыта	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
Контроль	94,8 ± 0,9	96,0 ± 1,4
Обработка СК 0,5 мМ	91,5 ± 1,9	94,0 ± 2,0
Обработка СК 0,05 мМ	92,3 ± 3,3	95,3 ± 0,6
Обработка СК 0,005 мМ	91,0 ± 1,7	94,0 ± 2,0
Обработка ЯК 0,5 мМ	91,5 ± 0,9*	93,5 ± 0,3
Обработка ЯК 0,05 мМ	91,8 ± 2,6	95,8 ± 1,1
Обработка ЯК 0,005 мМ	91,5 ± 1,7	95,8 ± 1,3

*- различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$

телей, а именно с более частым проявлением активирующего рост эффекта при применении салициловой и янтарной кислот низких концентраций и ингибиции при высоких концентрациях. Так, в исследовании Movaghatian, Khorsandi (2013) предпосевная обработка семян пшеницы 0,00001 mM и 0,001 mM салициловой кислотой увеличивала всхожесть по сравнению с контролем, а в концентрации 1 mM – снижала: самый высокий показатель всхожести (97,2 %) наблюдался при концентрации салициловой кислоты 0,00001 mM, а самый низкий (78,3 %) – при концентрации 1 mM (Movaghatian, Khorsandi, 2013). Исследование Dolatabadian et al. (2009) показало, что предварительное замачивание семян пшеницы в растворе салициловой кислоты 0,5 mM, в отличие от наших результатов, повышало всхожесть семян, но увеличение концентрации до 1 mM снижало данный показатель (Dolatabadian et al., 2009).

Определение морфометрических показателей используют у молодых проростков для прогноза возможной скорости роста и продуктивности растений. Этот метод является недеструктивным, отличается своей оперативностью, низкой трудоемкостью и простотой,

поэтому часто используется для характеристики проростков растений. Среди морфометрических показателей длину и ширину листьев и других органов можно легко и непосредственно измерить с помощью простейших приборов, они не требуют последующих громоздких вычислений (Полонский, Полякова, 2014). Салициловая и янтарная кислоты не изменили такие показатели, как длина побега и площадь второго листа. Можно отметить, что в наших экспериментах у 2-недельных проростков предпосевная обработка овса салициловой кислотой в концентрации 0,05 mM приводила к увеличению длины корня на 36 % (табл. 3).

Обработка растений пшеницы растворами салициловой и янтарной кислот также не приводила к существенным изменениям длины побега и корня и площади второго листа (табл. 4).

В отличие от наших результатов, в литературе представлены данные о выраженном активирующем или ингибирующем влиянии салициловой и янтарной кислот на морфометрические показатели. Так, в исследовании Рахманкуловой и др. (2006) предпосевная обработка семян пшеницы салициловой кислотой в концентрации 0,05 mM приводила

Таблица 3. Влияние салициловой и янтарной кислот на длину побега и корня и площадь второго листа растений овса

Table 3. The effects of salicylic and succinic acids on the length of the shoot and root and the area of the second leaf of oat plants

Вариант опыта	Длина побега, см	Длина корня, см	Площадь второго листа, см ²
Контроль	30,0 ± 1,9	10,7 ± 0,8	5,7 ± 0,6
Обработка СК 0,5 mM	31,8 ± 1,6	11,6 ± 0,9	6,5 ± 0,7
Обработка СК 0,05 mM	33,1 ± 1,5	14,6 ± 1,0*	6,8 ± 0,6
Обработка СК 0,005 mM	34,2 ± 0,9	10,0 ± 0,9	6,7 ± 0,4
Обработка ЯК 0,5 mM	31,6 ± 1,6	13,0 ± 1,3	7,4 ± 0,7
Обработка ЯК 0,05 mM	32,9 ± 1,0	12,2 ± 1,3	6,7 ± 0,4
Обработка ЯК 0,005 mM	31,6 ± 1,1	10,9 ± 1,2	7,0 ± 0,5

*- различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$

Таблица 4. Влияние салициловой и янтарной кислот на длину побега и корня и площадь второго листа растений пшеницы

Table 4. The effects of salicylic and succinic acids on the length of the shoot and root and the area of the second leaf of wheat plants

Вариант опыта	Длина побега, см	Длина корня, см	Площадь второго листа, см ²
Контроль	31,7 ± 0,8	10,8 ± 0,5	6,1 ± 0,4
Обработка СК 0,5 мМ	29,6 ± 1,2	9,6 ± 0,3	5,3 ± 0,2
Обработка СК 0,05 мМ	30,1 ± 0,7	10,4 ± 0,4	5,6 ± 0,3
Обработка СК 0,005 мМ	30,3 ± 0,8	10,8 ± 0,5	6,3 ± 0,2
Обработка ЯК 0,5 мМ	32,4 ± 1,5	9,9 ± 0,5	5,9 ± 0,5
Обработка ЯК 0,05 мМ	30,3 ± 1,4	10,2 ± 0,4	5,6 ± 0,3
Обработка ЯК 0,005 мМ	29,5 ± 1,0	10,6 ± 0,4	5,2 ± 0,3

к увеличению длины надземной и подземной частей растений. Салициловая кислота в концентрациях 0,5 мМ и 1 мМ увеличивала длину проростков и корней пшеницы (Dolatabadian et al., 2009). Обработка семян яровой мягкой пшеницы янтарной кислотой в концентрации 1 мМ увеличивала площадь листовой поверхности пшеницы на 17–20 % по сравнению с вариантом без обработки (Цыганова и др., 2019).

В то же время мы обнаружили стимулирующее действие салициловой и янтарной кислот не на длину, а на сырой и сухой вес побегов овса и пшеницы. Обработка семян овса салициловой кислотой в концентрации

0,05 мМ повышала сырой и сухой вес побега на 45 % и 56 % соответственно (табл. 5). А обработка семян пшеницы янтарной кислотой в концентрации 0,5 мМ приводила к увеличению сырого и сухого веса побега на 30 % и 48 % соответственно (табл. 6).

Для растений пшеницы, обработанных салициловой кислотой в концентрации 0,5 мМ, показано снижение сырого веса корня на 59 % (табл. 6).

Относительное содержание воды в побегах и корнях обоих видов растений почти не отличалось от контрольных групп – изменения этого показателя не превышали 4 %.

Таблица 5. Влияние салициловой и янтарной кислот на сырой и сухой вес побега и корня растений овса
Table 5. The effects of salicylic and succinic acids on the wet and dry weights of the shoot and the root of oat plants

Вариант опыта	Сырой вес побега, г	Сухой вес побега, г	Сырой вес корня, г	Сухой вес корня, г
Контроль	0,338 ± 0,047	0,025 ± 0,004	0,061 ± 0,023	0,004 ± 0,003
Обработка СК 0,5 мМ	0,249 ± 0,045	0,019 ± 0,004	0,036 ± 0,013	0,002 ± 0,001
Обработка СК 0,05 мМ	0,490 ± 0,022*	0,039 ± 0,002*	0,072 ± 0,015	0,004 ± 0,001
Обработка СК 0,005 мМ	0,312 ± 0,029	0,024 ± 0,003	0,031 ± 0,001	0,002 ± 0,001
Обработка ЯК 0,5 мМ	0,307 ± 0,070	0,026 ± 0,006	0,041 ± 0,002	0,002 ± 0,001
Обработка ЯК 0,05 мМ	0,360 ± 0,053	0,031 ± 0,005	0,073 ± 0,020	0,004 ± 0,001
Обработка ЯК 0,005 мМ	0,394 ± 0,063	0,033 ± 0,005	0,067 ± 0,011	0,003 ± 0,001

*- различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$

Таблица 6. Влияние салициловой и янтарной кислот на сырой и сухой вес побега и корня растений пшеницы

Table 6. The effects of salicylic and succinic acids on the wet and dry weights of the shoot and the root of wheat plants

Вариант опыта	Сырой вес побега, г	Сухой вес побега, г	Сырой вес корня, г	Сухой вес корня, г
Контроль	0,250 ± 0,019	0,025 ± 0,002	0,101 ± 0,015	0,005 ± 0,001
Обработка СК 0,5 мМ	0,247 ± 0,025	0,023 ± 0,003	0,041 ± 0,009*	0,003 ± 0,001
Обработка СК 0,05 мМ	0,285 ± 0,024	0,028 ± 0,002	0,092 ± 0,009	0,005 ± 0,001
Обработка СК 0,005 мМ	0,280 ± 0,005	0,029 ± 0,001	0,069 ± 0,011	0,006 ± 0,001
Обработка ЯК 0,5 мМ	0,325 ± 0,019*	0,037 ± 0,002*	0,079 ± 0,005	0,005 ± 0,001
Обработка ЯК 0,05 мМ	0,267 ± 0,048	0,029 ± 0,005	0,078 ± 0,009	0,005 ± 0,001
Обработка ЯК 0,005 мМ	0,255 ± 0,027	0,028 ± 0,002	0,081 ± 0,014	0,007 ± 0,001

*- различия с контролем статистически значимы, $p < 0,05$

Можно предположить, что в условиях нашего эксперимента при нормальном водоснабжении салициловая и янтарная кислоты изменили в первую очередь скорость накопления сухого вещества в проростках пшеницы и овса, не влияя на их водный обмен.

В литературе часто можно встретить сообщения о похожем эффекте увеличения сырой и сухой массы надземных частей при использовании близких к нашим концентраций салициловой и янтарной кислот. Так, обработка семян пшеницы 0,5 мМ и 1 мМ салициловой кислотой увеличивала сухой вес проростков (Dolatabadian et al., 2009). Обработка семян яровой мягкой пшеницы янтарной кислотой в концентрации 1 мМ увеличивала массу сухого вещества на 33 % в сравнении с вариантом без предпосевной обработки (Цыганова и др., 2019). В работе Hayat et al. (2005) показано, что предварительное замачивание семян пшеницы в растворе салициловой кислоты концентрации 0,01 мМ приводило к увеличению числа листьев, увеличению сырой и сухой массы, однако предварительное замачивание в более высокой концентрации 1 мМ салициловой кислоты снижало все вышеперечисленные параметры.

Предпосевная обработка семян пшеницы раствором 0,05 мМ салициловой кислоты способствовала увеличению массы надземных и подземных частей растений (Рахматуллина, 2007). Вероятнее всего, для растений пшеницы салициловая и янтарная кислоты в высоких концентрациях 0,5–1 мМ, первоначально снижая энергию прорастания, впоследствии вызывают большую скорость роста вегетативных органов у молодых растений.

Если сравнить действие исследуемых кислот между сельскохозяйственными культурами, то можно отметить, что салициловая кислота чаще оказывала положительный эффект, чем янтарная, на растения овса. На растения пшеницы оба исследованных регулятора роста оказывали слабое воздействие, но на основании увеличения веса побега лучше рекомендовать использование янтарной кислоты, чем салициловой.

Для активации всхожести предпочтительнее использовать низкие концентрации салициловой и янтарной кислот. Для увеличения размеров или массы проростков растений рекомендуется использовать салициловую или янтарную кислоту в более высоких концентрациях 0,05–0,5 мМ.

Заключение

Обработка семян овса салициловой кислотой в концентрации 0,005 мМ повышала всхожесть растений овса на 75 %. В более высокой концентрации 0,05 мМ салициловая кислота увеличивала длину корня овса на 36 % и повышала сырой и сухой вес побега на 45 % и 56 % соответственно. На растения пшеницы предпосевная обработка салициловой кислотой повлияла слабо, только в концентрации 0,5 мМ наблюдалось снижение сырого веса корня на 59 %.

Предпосевная обработка растений овса янтарной кислотой в концентрации 0,5 мМ снижала энергию прорастания на 40 %, а в более низкой концентрации 0,005 мМ, наоборот, увеличивала этот показатель на 56 %. Также янтарная кислота в концентрации 0,005 мМ повышала всхожесть овса на 53 %.

У растений пшеницы янтарная кислота в высокой концентрации 0,5 мМ приводила к увеличению сырого и сухого веса побега на 30 % и 48 % соответственно.

При использовании правильно подобранных концентраций салициловой и янтарной кислот можно добиться повышения всхожести семян и увеличения роста и веса растений овса и пшеницы. Для растений овса предпочтительно использование салициловой кислоты в концентрациях 0,005–0,05 мМ. Для растений пшеницы лучше применять янтарную кислоту в концентрации 0,5 мМ.

Таким образом, предпосевную обработку семян растений овса и пшеницы салициловой и янтарной кислотами можно рассматривать в качестве метода улучшения роста растений при условии использования правильно подобранных концентраций.

Список литературы / References

Байбурина Э.В., Фазлутдинова А.И. (2015) Влияние салициловой кислоты на растения (теоретические аспекты). *Молодой ученый*, 7: 233–235 [Bayburina E. V., Fazlutdinova A. I. (2015) Effect of salicylic acid on plants (theoretical aspects). *Young Scientist* [Molodoi uchenyi], 7: 233–235 (in Russian)]

Беляев А. Б. (2000) *Методические указания к лабораторно-практическим занятиям по общему земледелию*. Воронеж, ВГУ, 43 с. [Belyaev A. B. (2000) *Methodical instructions for laboratory and practical exercises in general agriculture*. Voronezh, Voronezh State University, 43 p. (in Russian)]

Гланц С. (1998) *Медико-биологическая статистика*. М., Практика, 459 с. [Glantz S. (1998) *Biomedical statistics*. Moscow, Praktika, 459 p. (in Russian)]

Грабовская Н. И., Бабенко О. Н., Сафонова Н. М., Хусаинова Р. К. (2020) Особенности применения янтарной кислоты в качестве биостимулятора и адаптогена растений. *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: естественные и технические науки*, 1: 28–32 [Grabovskaya N. I., Babenko O. N., Safronova N. M., Khusainova R. K. (2020) Features of the use of succinic acid as a biostimulator and plant adaptogen. *Modern Science: Actual Problems of Theory and Practice. Series: Natural and Technical Sciences* [Sovremennaya nauka: aktual'nye problemy teorii i praktiki. Seriya: estestvennye i tekhnicheskie nauki], 1: 28–32 (in Russian)]

Полонский В.И., Полякова И.С. (2014) Морфометрические показатели листьев *Syringa josikaea* Jacq. в оценке качества городской среды. *Вестник КрасГАУ*, 8: 130–133 [Polonskiy V. I., Polyakova I. S. (2014) Morphometric parameters of *Syringa josikaea* Jacq. leaves in the urban environment quality assessment. *Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University* [Vestnik KrasGAU], 8: 130–133 (in Russian)]

Рахманкулова З.Ф., Рахматуллина С.Р., Федяев В.В. (2006) Влияние салициловой кислоты на про/антиоксидантный статус и энергетический баланс проростков пшеницы. *Вестник Башкирского университета*, 11(4): 41–43 [Rakhmankulova Z.F., Rakhmatullina S.R., Fedyaev V.V. (2006) The effect of salicylic acid on the pro / antioxidant status and energy balance of wheat seedlings. *Bulletin of Bashkir University* [Vestnik Bashkirskogo universiteta], 11(4): 41–43 (in Russian)]

Рахматуллина С.Р. (2007) Участие дыхательных путей в регуляции антиоксидантных систем у растений пшеницы. Автoref. дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Уфа, 23 с. [Rakhmatullina S.R. (2007) The involvement of the respiratory tract in the regulation of antioxidant systems in wheat plants. Abstract of dissertation for the degree of candidate of biological sciences. Ufa, 23 p. (in Russian)]

Тарчевский И.А., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. (1999) Янтарная кислота – миметик салициловой кислоты. *Физиология растений*, 46(1): 23–25 [Tarchevsky I.A., Maksyutova N.N., Yakovleva V.G., Grechkin A.N. (1999) Succinic acid is a salicylic acid mimetic. *Plant Physiology* [Fiziologiya rastenii], 46(1): 23–25 (in Russian)]

Тарчевский И.А. (2002) *Сигнальные системы клеток растений*. М., Наука, 294 с. [Tarchevsky I.A. (2002) *Signaling systems of plant cells*. Moscow, Nauka, 294 p. (in Russian)]

Цыганова Н.А., Воронкова Н.А., Дороненко В.Д., Балабанова Н.Ф. (2019) Влияние янтарной кислоты на фотосинтетическую активность яровой мягкой пшеницы. *Вестник Омского государственного аграрного университета*, 3: 13–20 [Tsyganova N.A., Voronkova N.A., Doronenko V.D., Balabanova N.F. (2019) The influence of succinic acid on the photosynthetic activity of spring soft wheat. *Bulletin of Omsk State Agrarian University* [Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta], 3: 13–20 (in Russian)]

Dolatabadian A., Modarres Sanavy S. A. M., Sharifi M. (2009) Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B. Soil and Plant Science*, 59(5): 456–464

Hayat S., Fariduddin Q., Ali B., Ahmad A. (2005) Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agronomica Hungarica*, 53(4): 433–437

Movaghatian A., Khorsandi F. (2013) Effects of salicylic acid on wheat germination parameters under drought stress. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 13(12): 1603–1608

Prodhan M. Y., Munemasa S., Nahar M. N., Nakamura Y., Murata Y. (2018) Guard cell salicylic acid signaling is integrated into abscisic acid signaling via the Ca^{2+} /CPK-dependent pathway. *Plant Physiology*, 178(1): 441–450

Raskin I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 439–463

Vasyukova N.I., Ozeretskovskaya O.L. (2007) Induced plant resistance and salicylic acid: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(4): 367–373

Vlot A. C., Dempsey D. A., Klessig D. F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177–206

EDN: PDKKRC

УДК 547.992.2:631.589.2

Dose-Dependent Effects of Nanoscale Forms of Humic Acids in a Hydroponic Culture of *Triticum aestivum*: Induction of Oxidative Stress and an Increase in the Number of Border Cells

**Natalia G. Menzyanova^a, Svetlana A. Pyatina^{a*},
Alexander V. Shabanov^b and Ekaterina I. Shishatskaya^a**

^a Siberian Federal University

Russian Federation, Krasnoyarsk

^b L. V. Kirensky Institute of Physics SB RAS

Russian Federation, Krasnoyarsk

Received 28.02.2022, received in revised form 15.11.2022, accepted 05.12.2022

Abstract. The biological activity of humic acids in the form of nanoparticles with a size of 6.5 nm and 68 nm was studied in a hydroponic culture of *Triticum aestivum* L. Both smaller and larger humic nanoparticles at the studied concentrations neither inhibited root growth nor caused destructive changes in the root apices of 2-day-old seedlings. A dose-dependent increase in the contents of markers of induced oxidative stress such as carbonylated proteins, malonaldehyde, and proline was observed in the roots of seedlings on media with humic nanoparticles. Malondialdehyde was the main product of free radical oxidation for smaller nanoparticles and carbonylated proteins – for larger ones. Oxidative stress induced by humic nanoparticles was accompanied by a dose-dependent increase in the number of free border cells and the size of the mucilaginous sheaths on the root apices of 2-day-old seedlings. For smaller (6.5 nm) nanoparticles, these changes were much more pronounced than for larger (68 nm) nanoparticles. The results obtained allow us to consider humic nanoparticles as adaptogens: contributing to an increase in the population of border cells and the mucilaginous sheath system (as a product of the excretory activity of border cells), nanoparticles enhance the resistance of the root apex to the effects of unfavorable biotic and abiotic factors.

Keywords: hydroponic culture of *Triticum aestivum*, humic acids, border cells, oxidative stress, root apex, rhizosphere.

© Siberian Federal University. All rights reserved

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

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

ORCID: 0000-0003-3930-6923 (Pyatina S.); 0000-0001-7967-243X (Shishatskaya E.)

Citation: Menzyanova N. G., Pyatina S. A., Shabanov A. V., Shishatskaya E. I. Dose-dependent effects of nanoscale forms of humic acids in a hydroponic culture of *Triticum aestivum*: induction of oxidative stress and an increase in the number of border cells. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2023, 16(1), 64–86. EDN: PDKKRC.



Дозозависимые эффекты наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре *Triticum aestivum*: индукция окислительного стресса и увеличение численности пограничных клеток

Н. Г. Мензянова^а, С. А. Пятина^а,
А. В. Шабанов^б, Е. И. Шишацкая^а

^аСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

^бИнститут физики им. Л. В. Киренского СО РАН
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. В гидропонной культуре *Triticum aestivum* L. изучали биологическую активность гуминовых кислот в форме наночастиц размером 6,5 нм и 68 нм. Гуминовые наночастицы (мелкие и крупные) в изученных концентрациях не ингибировали рост корня и не вызывали деструктивных изменений корневого апекса 2-дневных проростков. На средах с гуминовыми наночастицами в корнях проростков наблюдалось дозозависимое увеличение содержания карбонилированных белков, малонового альдегида и пролина – маркеров индуцированного окислительного стресса. Для мелких наночастиц основным продуктом свободнорадикального окисления был малоновый диальдегид, для крупных – карбонилированные белки. Индуцированный гуминовыми наночастицами окислительный стресс сопровождался дозозависимым увеличением численности свободных пограничных клеток и размеров гелевого чехла в корневом апексе 2-дневных проростков. Для мелких наночастиц (6,5 нм) эти изменения были выражены в значительно большей степени, чем для крупных наночастиц (68 нм). Полученные результаты позволяют рассматривать гуминовые наночастицы в качестве адаптогенов: способствуя увеличению численности популяции пограничных клеток и системы гелевого чехла (как продукта экскреторной активности пограничных клеток), наночастицы увеличивают устойчивость корневого апекса к воздействию неблагоприятных биотических и абиотических факторов.

Ключевые слова: гидропонная культура *Triticum aestivum*, гуминовые кислоты, пограничные клетки, окислительный стресс, корневой апекс, ризосфера.

Цитирование: Мензянова, Н. Г. Дозозависимые эффекты наноразмерных форм гуминовых кислот в гидропонной культуре *Triticum aestivum*: индукция окислительного стресса и увеличение численности пограничных клеток / Н. Г. Мензянова, С. А. Пятина, А. В. Шабанов, Е. И. Шишацкая // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 64–86. EDN: PDKKRC.

Введение

Гуминовые кислоты (ГК) – водорастворимые органические соединения, которые образуются в результате биодеградации растительных и животных останков с участием почвенных микроорганизмов (Stevenson, 1994). ГК используются как стимуляторы роста растений (Chen et al., 2017; Busato et al., 2018; Morozesk et al., 2017) и как агенты, повышающие устойчивость растений к различным стресс-факторам (Taspinar et al., 2017; Ondrasek et al., 2018) и нематодным инфекциям (Kesba, El-Beltagi, 2012). Многочисленные экспериментальные данные позволяют полагать, что биологические эффекты ГК реализуются через перестройку систем транскрипции и посттрансляционных событий, что приводит к значительным изменениям метаболизма и процессов развития и роста растений (Mora et al., 2014; Tahiri et al., 2016). Однако сигнальные пути и эффекторные миши ГК изучены фрагментарно и отсутствует комплексная модель биотропных эффектов ГК (Mora et al., 2014).

В большинстве случаев эффекты ГК связывают с гормон- и АФК- зависимым сигналингом (Nagasawa et al., 2016; García et al., 2016 b; Olaetxea et al., 2016). Взаимодействие этих двух систем сигналинга определяет стимулирующее влияние ГК на рост побегов и корневой системы. Но тонкие регуляторные взаимодействия этих систем сигналинга могут варьировать в зависимости от вида и возраста растений, условий культивирования, а также от концентрации и способов получения ГК (Trevisan et al., 2010). Так, ГК, полученные из почвы, стимулируют углеродный метаболизм (Muscolo et al., 2007), а ГК, выделенные из вермикомпоста, – развитие боковых корней (Aguiar et al., 2013). ГК лигнита (с меньшим молекулярным весом) более эффективны как стимуляторы роста корней, чем ГК, полученные из навоза крупного рогатого скота (Nagasawa et al., 2016). Показано, что такие

параметры, как лабильность и устойчивость, могут влиять на биологическую активность препаратов ГК (García et al., 2016a).

В условиях массового культивирования вариабельность эффективности препаратов ГК может значительно влиять на урожайность и себестоимость продукции. Это определяет практическую значимость изучения биологической активности препаратов ГК в модельных системах для прогнозирования их эффективности в условиях агрокультуры.

В связи с этим целью представленной работы было изучение биологической активности препаратов ГК, полученных электрохимическим методом из водных суспензий торфа, в гидропонной культуре проростков *Triticum aestivum* L.

Материалы и методы

Проращивание зерна

Зерно пшеницы промывали в течение 5–6 ч под проточной водой и замачивали на 24 ч в дистиллированной воде при комнатной температуре. Проклюнувшиеся зерновки раскладывали по чашкам Петри по 50 штук в каждую. В контрольном варианте в чашки вносили по 7 мл дистиллированной воды. В экспериментальные варианты вносили по 7 мл растворов гуминовых наночастиц с концентрацией 5, 25 и 100 мг/л.

Стабильные водные растворы гуминовых кислот (концентрация 1 г/л, по методу Lamar et al., 2014) в форме наночастиц были предоставлены ООО «Биотех» (Красноярск). Гуминовые наночастицы получали из торфа (Кедровское месторождение, переходный тип торфа) электрохимическим методом. Размеры наночастиц определяли на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Ltd., Великобритания). Исходные растворы гуминовых кислот разводили дистиллированной водой для получения необходимых концентраций.

Зерно проращивали при комнатной температуре. У 2-дневных проростков определяли длину главного корня.

Оценка численности популяции пограничных клеток

Пограничные клетки смывали с поверхности корневого апекса на магнитной мешалке. Для этого срезали 20 главных корней 2-дневных проростков, зажимали пинцетом и смывали в 1 мл дистиллированной воды на магнитной мешалке в течение 1 мин. Полученную суспензию клеток центрифугировали 3000г, 10 мин. Супернатант после центрифугирования представлял собой водный раствор компонентов гелевого чехла (белков, полисахаридов и др.). Супернатант собирали для определения общего белка по Лоури (Lowry et al., 1951). Осадок пограничных клеток суспендировали в дистиллированной воде и повторно центрифугировали 3000г, 10 мин. Клеточный осадок фиксировали в 500 мкл 2,5 % глутарового альдегида (на фосфатном буфере, pH 7,0) 1 ч. После фиксации клетки дважды промывали дистиллированной водой и окрашивали 0,01 % трипановым синим. В клеточной суспензии определяли общее количество клеток (одиночные клетки, клеточные цепочки, клеточные пласти) и количество одиночных клеток в %.

Получение полутонких срезов

У 2-дневных проростков срезали главные корни. Корни фиксировали в 2,5 глутаровом альдегиде на фосфатно-солевом растворе, pH=7,0, в течение 3 ч. Корни отмывали от фиксатора в дистиллированной воде и повторно фиксировали в 1 % OsO₄, 30 мин. После второй фиксации корни промывали дистиллированной водой, обезвоживали образцы в спиртах восходящей концентрации и ацетоне и заливали в эпон (EMbed 812 Kit, Merck). Полутонкие срезы окрашивали 1 % основ-

ным фуксином и 0,1 % толуидиновым синим в 2,5 % Na₂CO₃ (pH 11,1). На срезы наносили эпон, накрывали покровными стеклами и после полимеризации препараты анализировали под световым микроскопом.

Подготовка образцов для сканирующей электронной микроскопии

Образцы фиксировали и обезвоживали как описано в предыдущем пункте, напыляли платиной и анализировали с помощью сканирующего микроскопа TM-3000 (Japan).

Определение содержания карбонилированных белков, малонового диальдегида и пролина

У 2-дневных проростков срезали главные корни с корневыми апексами длиной в 1 см. Полученную биомассу корней гомогенизировали в 0,05 М Трис-HCl буфере, pH=7,4, при T=4 °C. Гомогенаты центрифугировали для удаления грубого дебриса при 5000г, 45 мин, при T=4 °C. Супернатант собирали и использовали для определения содержания карбонилированных белков по методу Carty et al. (2000), малонового диальдегида по методу Bailly et al. (1996) и пролина по методу Bates et al. (1973). Содержание карбонилированных белков, малонового диальдегида и пролина пересчитывали на 1 мг белка гомогената корней. Содержание белка в гомогенате корней определяли по методу Lowry et al. (1951). Статистическую обработку результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты

*Влияние гуминовых наночастиц на длину корня и популяцию пограничных клеток в корневом апексе проростков *T. aestivum**

Мелкие гуминовые наночастицы (средний размер 6,5 нм) в изученных концентраци-

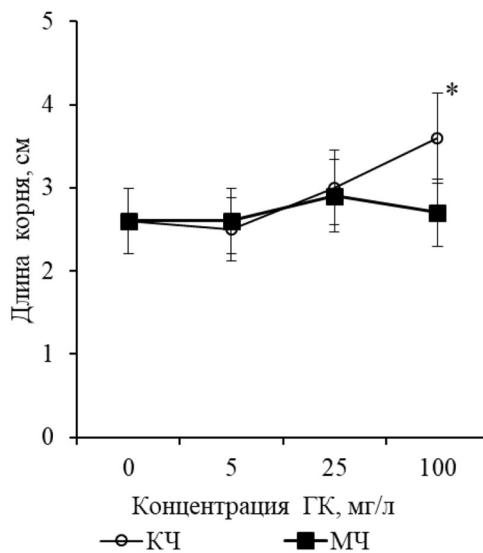


Рис. 1. Длина главного корня 2-дневных проростков пшеницы. Культивирование на средах с различными концентрациями гуминовых наночастиц. * – значение, достоверно отличающееся от контрольного варианта ($p<0,05$). КЧ – крупные наночастицы (68 нм), МЧ – мелкие наночастицы (6,5 нм)

Fig. 1. Length of the main roots of 2-day-old wheat seedlings. Cultivation on media with different concentrations of humic nanoparticles. * – value significantly different from the control ($p<0.05$). КЧ – larger nanoparticles (68 nm), МЧ – smaller nanoparticles (6,5 nm)

ях не влияли на длину корней 2-дневных проростков. Крупные гуминовые наночастицы (средний размер 68 нм) стимулировали рост корней только в концентрации 100 мг/л: длина корней была в 1,4 раза больше, чем в контроле (рис. 1). Таким образом, в гидропонной культуре существенной стимуляции роста корня на средах с гуминовыми наночастицами не наблюдалось.

На следующем этапе работы эффекты гуминовых наночастиц оценивали на уровне ризосфера. Ризосфера является одной из потенциальных эффекторных мишеней стандартных препаратов ГК. Важную роль в формировании ризосферной системы развивающегося проростка играют пограничные

клетки (ПК) корневого апекса. ПК на поверхности корневого апекса выявляются на самых ранних этапах прорастания корня; вероятно, эта популяция клеток формируется еще под колеоризой (рис. 2).

ПК представляют собой морфологически гетерогенную популяцию клеток (рис. 3). На вершине апекса локализуются округлые клетки, по мере удаления от вершины апекса клетки удлиняются, приобретая палочковидную форму. На микрофотографиях можно наблюдать различные фазы и особенности отделения ПК от корневого апекса. Округлые и овальные клетки на вершине апекса «уходят» в матрикс гелевого чехла «по одиночке». На боковых поверхностях удлиненные клетки, и особенно палочковидные клетки, отслаиваются группами, в форме длинных цепочек и пластов: ПК теряют контакты с поверхностью апекса, но сохраняют контакты с соседними клетками в отделяющемся монослое.

Свободные одиночные ПК и агрегаты ПК удерживаются вблизи корневого апекса матриксом гелевого чехла, сформированным продуктами экскреции ПК (рис. 3 б-г). Известно, что ПК активно экскретируют в ризосферу более 100 различных белков (Knox et al., 2007; Wen et al., 2007).

О размерах гелевого чехла можно судить по величине «разброса» свободных ПК. Небольшие гелевые чехлы с немногочисленной популяцией ПК наблюдаются в контрольном варианте (проращивание на дистиллированной воде) (рис. 3 а). При культивировании на средах с гуминовыми наночастицами размеры гелевых чехлов значительно увеличиваются: свободные ПК могут находиться на расстоянии 500–600 мкм от поверхности корневого апекса (рис. 3 б-г). При этом значительно увеличивается и численность свободных ПК в составе гелевого чехла.

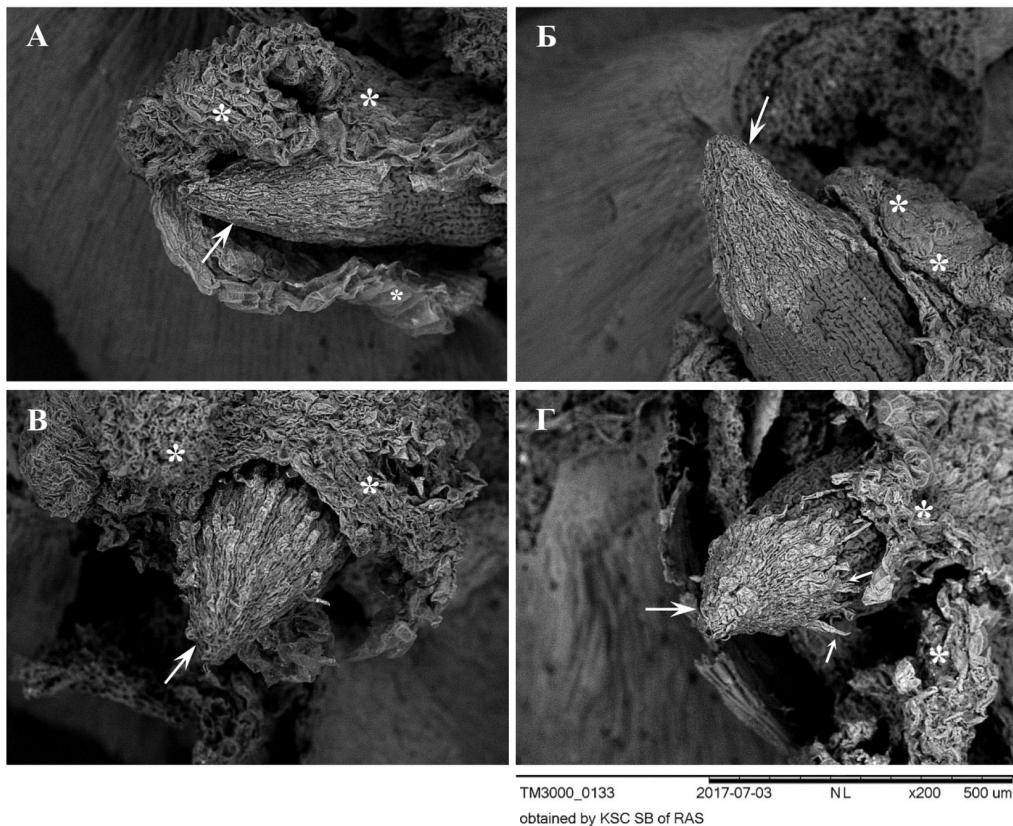


Рис. 2. Популяция пограничных клеток (ПК) в корневом апексе проростков пшеницы (8–10 ч проращивания). Длина главного корня 250–500 мкм. А, Б – контрольный вариант (проращивание на дистиллированной воде); В, Г – проращивание на среде с гуминовыми наночастицами. Корни окружены разорванной колеоризой (белые звездочки). Корневые апексы покрыты ПК: шапочками из светло-серых клеток с выступающими на поверхности округлыми ядрами (белые стрелки). В контрольном варианте (А, Б) ПК плотно прилегают к поверхности апекса. На средах с гуминовыми наночастицами наблюдается разрыхление слоя ПК (В) и отслаивание клеток от поверхности (Г, по нижнему краю шапочки ПК, короткие стрелки)

Fig. 2. Border cell (BC) population in the root apex of wheat seedlings (8–10 h, germination). The length of the main root is 250–500 μ m. A, B – control (germination on distilled water); B, Г – germination on the medium with humic nanoparticles. Roots are surrounded by ruptured coleorhiza (white stars). Root apices are covered with BCs: caps of light gray cells with rounded nuclei protruding on the surface (white arrows). In the control (A, B), BCs closely adhere to the surface of the apex. On media with humic nanoparticles, loosening of the BC layer (B) and exfoliation of cells from the surface (Г, along the lower edge of the BC cap, short thin arrows) are observed

Для вариантов культивирования с гуминовыми наночастицами можно выделить 3 морфотипа ризосферного пространства вокруг апекса (рис. 3 б-г):

1. Активное боковое отслаивание цепочек удлиненных, палочковидных клеток.

Из цепочек ПК вокруг апекса формируется «венчик», который сохраняет контакт с корневым апексом (за счет клеток в основании

«венчика») (рис. 3 б). При культивировании на среде с наночастицами размером 6,5 нм (100 мг/л) почти у половины проанализированных корневых апексов ($47\pm8\%$) наблюдалось выраженное боковое отслаивание ПК.

2. Активное отделение ПК с вершины апекса (одиночные клетки) и с боковой поверхности апекса (рис. 3 в).

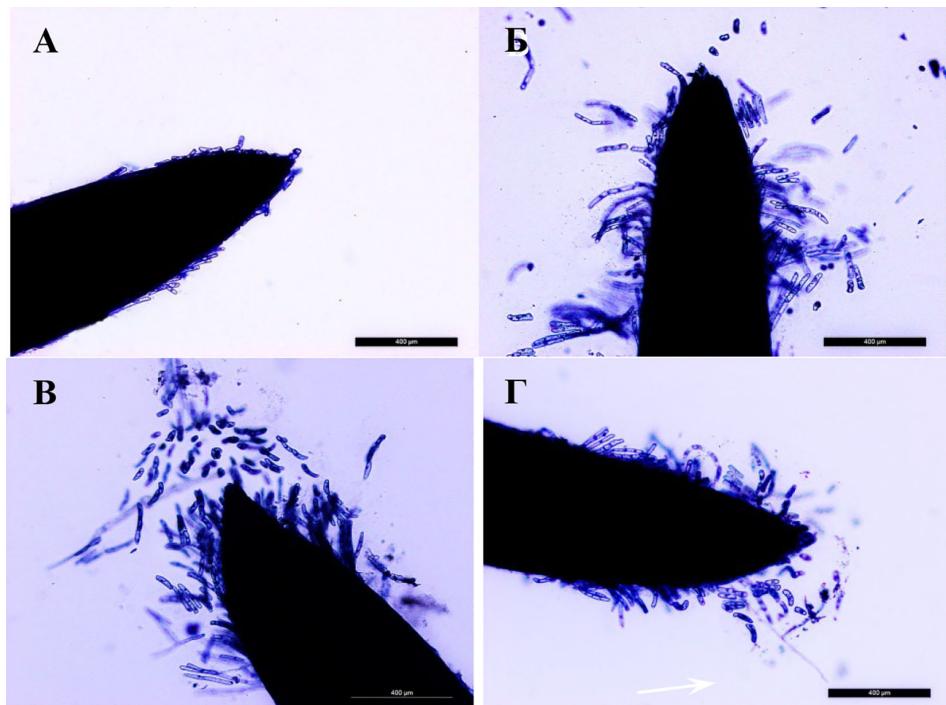


Рис. 3. Корневой апекс 2-дневных проростков пшеницы. Окраска трипановым синим. Масштабная линейка 400 мкм. А – культивирование на дистиллированной воде. Б, В, Г – культивирование на среде с гуминовыми наночастицами. Б – активное боковое отслаивание цепочек удлиненных, палочковидных клеток. Из цепочек пограничных клеток (ПК) вокруг апекса формируется «венчик», который сохраняет контакт с корневым апексом (за счет клеток в основании «венчика»); В – активное отделение ПК с вершины апекса (одиночные клетки) и с боковой поверхности апекса; Г – поверхность апекса покрыта рыхло расположеными клетками, многие из которых еще сохраняют контакты с поверхностью апекса

Fig. 3. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. Trypan blue stain. Scale bar 400 μ m. A – cultivation on distilled water. Б, В, Г – cultivation on the medium with humic nanoparticles. Б – active lateral exfoliation of chains of elongated, rod-shaped cells. The border cell (BC) chains form a “circlet” around the apex, which maintains contact with the root apex (due to the cells at the base of the “circlet”); В – active separation of BCs from the top of the apex (single cells) and from the lateral surface of the apex; Г – the surface of the apex is covered with loosely located cells, many of which still retain contact with the surface of the apex

3. Вся поверхность апекса покрыта рыхло расположеными клетками, многие из которых еще сохраняют контакты с поверхностью апекса (рис. 3 г).

Эффекты гуминовых наночастиц были выявлены только в популяции ПК. Анализ серийных полутонких срезов корневого апекса не выявил деструктивных изменений цитоархитектоники апикальной меристемы проростков в условиях культивирования на средах с мелкими и крупными гуминовыми наночастицами (для всех исследованных

концентраций, рис. 4 г-и, 5 б). В то же время на поперечных и продольных полутонких срезах выявляется хорошо развитый гелевый чехол с многочисленными ПК, утратившими контакт с поверхностью корневого апекса (рис. 4 г-и, 5 б). В контроле (дистиллированная вода) гелевый чехол был идентифицирован в виде узкого цветного кольца по периметру среза (рис. 4 а-в, 5 а). Анализ корневых апексов проростков с помощью сканирующей электронной микроскопии показал, что поверхность эпидермы (ризодермы) при культи-

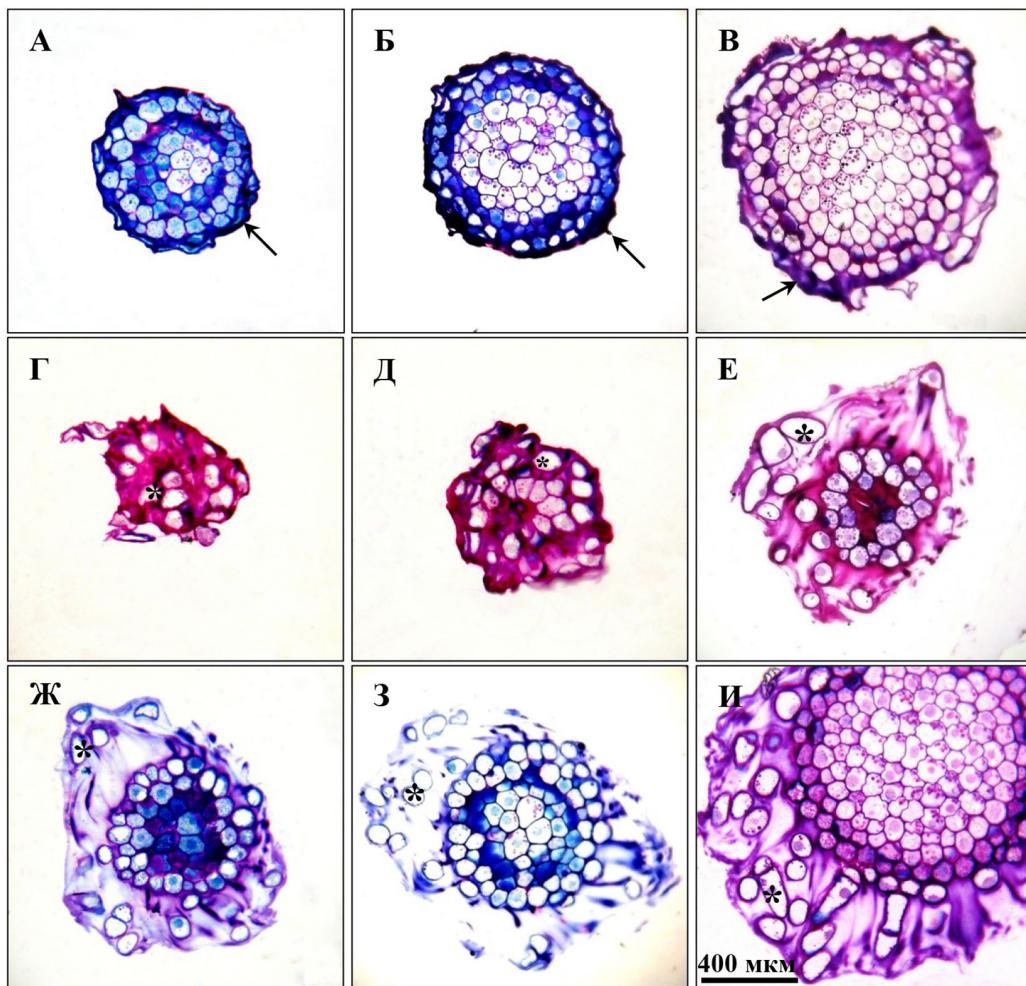


Рис. 4. Корневой апекс 2-дневных проростков пшеницы. Серийные поперечные полутонкие срезы, от вершины апекса к основанию. Окраска основным фуксином и толуидиновым синим. А, Б, В – корневой апекс в контроле (проращивание на дистиллированной воде). По периметру срезов локализуется узкий ободок гелевого чехла фиолетового цвета (указано стрелками). Г-И – корневой апекс на среде с гуминовыми наночастицами. Апекс окружен хорошо развитым гелевым чехлом: субстанция, окрашенная в фиолетово-пурпурный цвет, в которой находятся пограничные клетки (ПК), утратившие контакт с поверхностью апекса (ПК отмечены черными звездочками). Гелевый чехол закрывает вершину и боковую поверхность апекса. Г, Д – срез верхней части гелевого чехла со свободными ПК, без среза самого корневого апекса

Fig. 4. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. Serial transverse semi-thin sections, from the top to the base of the apex. Stained with basic magenta and toluidine blue. A, B, В – root apex in control (germination in distilled water). Along the perimeter of the sections, there is a narrow rim of a violet mucilaginous sheath (indicated by arrows). Г-И – root apex on a medium with humic nanoparticles. The apex is surrounded by a well-developed mucilaginous sheath: a violet-purple colored substance containing border cells (BCs) that have lost contact with the apex surface (BCs are marked with black asterisks). The mucilaginous sheath covers the top and the lateral surface of the apex. Г, Д – section of the upper part of the mucilaginous sheath with free BCs, with root apex uncut

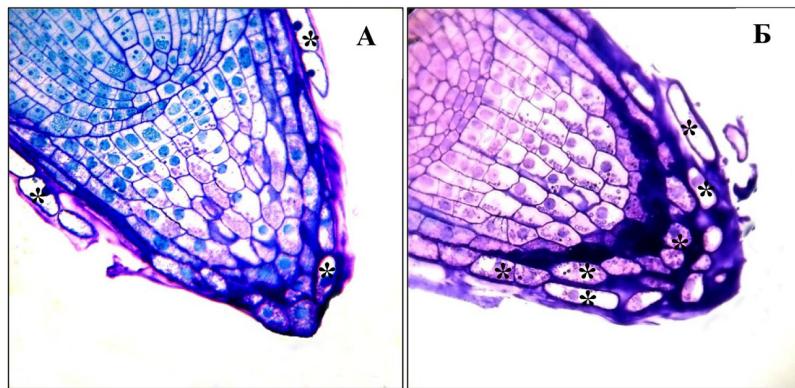


Рис. 5. Корневой апекс 2-дневных проростков пшеницы. Полутонкие продольные срезы. Плоскость среза проходит выше середины апекса. А – апекс в контрольном варианте (проращивание на дистиллированной воде). Б – апекс на среде с гуминовыми наночастицами. На вершине апекса располагаются пограничные клетки (отмечены черными звездочками), которые утратили контакт с боковой поверхностью апекса, нодерживаются за счет гелевого чехла

Fig. 5. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. Semi-thin longitudinal sections. The plane of the cut passes above the middle of the apex. А – apex in the control (germination in distilled water). Б – apex on the medium with humic nanoparticles. At the top of the apex, there are border cells (marked with black asterisks) that have lost contact with the lateral surface of the apex but are held by the mucilaginous sheath

вировании на средах с гуминовыми наночастицами оставалась интактной, без видимых изменений (рис. 6 б-г). На участках поверхности эпидермы, от которых отделялись ПК, также отсутствовали видимые деструктивные изменения (рис. 7 б-г).

Для оценки количества ПК, уже потерявших контакт с поверхностью корневого апекса, гелевый чехол смывали на магнитной мешалке и анализировали полученную популяцию клеток. Было показано, что после «растворения» гелевого чехла контакты между клетками сохраняются: в клеточной суспензии наряду с одиночными клетками наблюдались клеточные цепочки и клеточные пласти (рис. 8). В контроле количество одиночных клеток составило 47 % от общего числа ПК, смытых с поверхности корневого апекса. Внесение в культуральную среду крупных гуминовых наночастиц (68 нм) в концентрации 100 мг/л приводило к увеличению числа одиночных клеток в 1,4 раза, а мелких наночастиц (6,5 нм) в той же концентрации, наобо-

рот, – к снижению количества одиночных ПК в 1,6 раза по сравнению с контролем (рис. 9). То есть на среде с крупными наночастицами ПК уходили в ризосферу в основном в виде одиночных клеток (64 % одиночных клеток), а на среде с мелкими наночастицами – в основном в виде клеточных пластов и клеточных цепочек (71 % всех ПК).

Гуминовые наночастицы не только влияли на «способ» перехода ПК в ризосферу, но и вызывали дозозависимое увеличение численности ПК в ризосфере. Так, крупные наночастицы в концентрации 100 мг/л увеличивали количество ПК в 1,6 раза, а мелкие наночастицы – в 3,7 раза, по сравнению с контрольным вариантом (рис. 10).

Активное смывание позволило не только собрать ПК, но и получить раствор компонентов гелевого чехла и определить содержание общего белка в нем. На средах с гуминовыми наночастицами наблюдалось дозозависимое увеличение содержания белка в гелевом чехле корневого апекса 2-дневных проростков

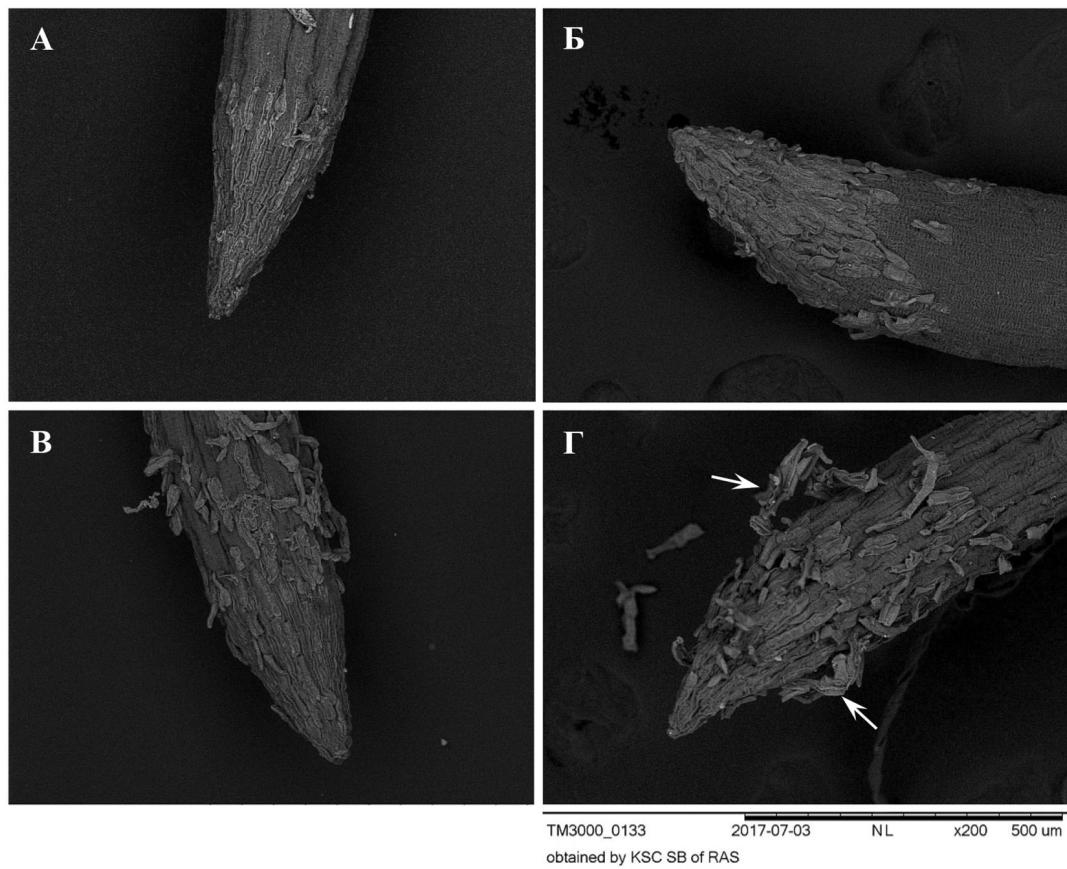


Рис. 6. Корневые апексы 2-дневных проростков пшеницы. А – контрольный вариант, проращивание на дистиллированной воде; пограничные клетки (ПК) плотно прижаты к поверхности апекса. Б, В, Г – проращивание на среде с гуминовыми наночастицами. Б – рыхлый слой ПК, которые еще не утратили связи с апексом; В – от поверхности апекса отделяются одиночные клетки; Г – ПК отделяются от поверхности апекса пластами (указано стрелками). Поверхность эпibleмы (ризодермы) в контроле и экспериментальных вариантах одинакова (темно-серые гофрированные участки поверхности корня). Под отделяющимися ПК поверхность эпibleмы сохраняет свою интактность

Fig. 6. Root apices of 2-day-old wheat seedlings. A – control, germination on distilled water; border cells (BCs) closely adhere to the surface of the apex. Б, В, Г – germination on the medium with humic nanoparticles. Б – loose layer of BCs that have not yet lost contact with the apex; В – single cells are separated from the surface of the apex; Г – BCs are separated from the surface of the apex in layers (indicated by arrows). The surface of the epiblema (rhizodermis) in the control and treatments is the same (dark gray corrugated areas of the root surface). Under the flaking BCs, the surface of the epiblema remains intact

(рис. 11). Поскольку компоненты гелевого чехла (в том числе и белки) экскретируются ПК, выявленные закономерности могут быть связаны как с увеличением количества ПК, так и с увеличением их секреторной активности. Для оценки влияния гуминовых наночастиц на экскреторную активность ПК использовали расчетный показатель: отно-

шение «содержание белка в одном гелевом чехле»/«количество ПК на апекс». Это соотношение определяли как экскреторную активность ПК.

Гуминовые наночастицы достоверно повышали экскреторную активность ПК, но дозозависимая динамика экскреторной активности существенно отличалась для круп-

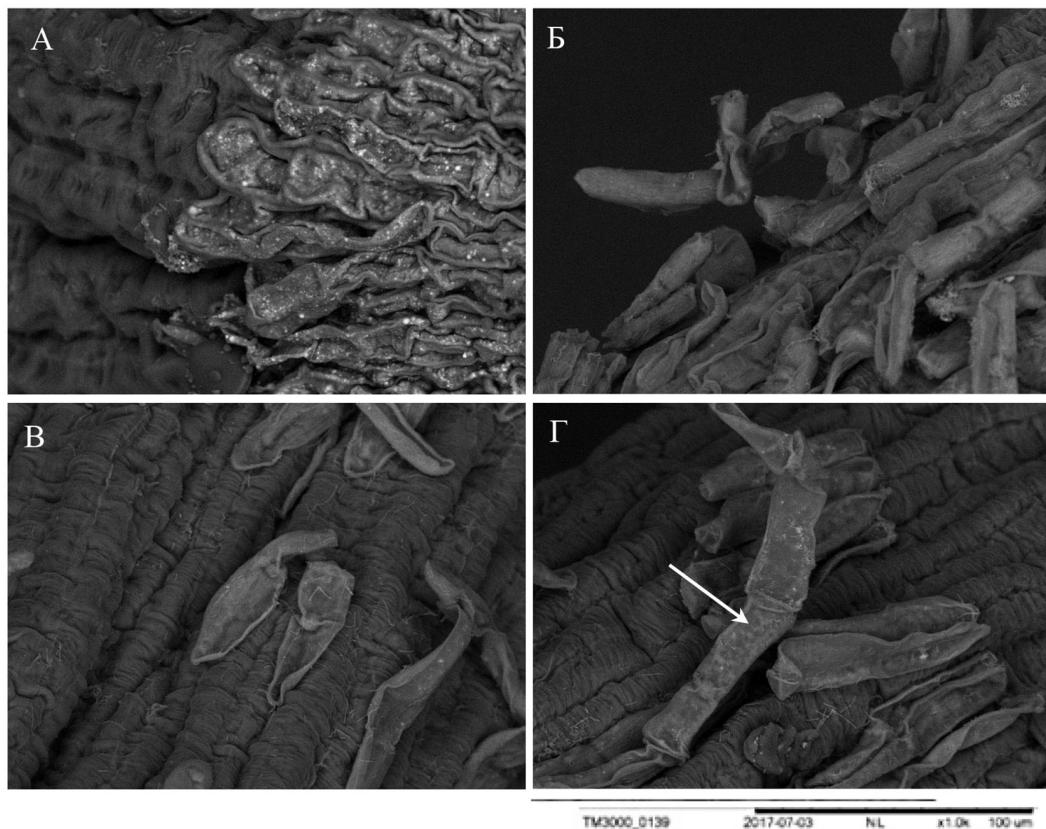


Рис. 7. Пограничные клетки (ПК) корневого апекса 2-дневных проростков пшеницы. А – контрольный вариант, проращивание на дистиллированной воде; ПК плотно прижаты к поверхности апекса и контактируют друг с другом, образуя монослой. Б, В, Г – проращивание на среде с гуминовыми наночастицами. Б – рыхлый слой ПК на поверхности апекса, контакты в слое ПК уже нарушены, но есть точки «соприкосновения» с поверхностью апекса; В – одиночные ПК, отделяющиеся от поверхности апекса; Г – ПК отделяются от поверхности апекса цепочкой (указано стрелкой)

Fig. 7. Border cells (BCs) of the root apices of 2-day-old wheat seedlings. A – control, germination on distilled water; BCs closely adhere to the surface of the apex and are in contact with each other, forming a monolayer. Б, В, Г – germination on the medium with humic nanoparticles. Б – loose BC layer on the apex surface; contacts in the BC layer are already broken, but there are points of “contact” with the apex surface; В – single BCs separating from the surface of the apex; Г – BC chains are detached from the surface of the apex (indicated by an arrow)

ных и мелких наночастиц (рис. 12). Так, наночастицы размером 68 нм в концентрации 5 мг/л повышали экскреторную активность ПК, но дальнейшее увеличение концентрации наночастиц не приводило к существенным изменениям экскреторной активности. Для мелких наночастиц (6,5 нм) максимальный стимулирующий эффект наблюдался для концентрации 25 мг/л, а при концентрации 100 мг/л наблюдалось резкое снижение экскреторной активности ПК.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гуминовые наночастицы увеличивают активность отделения ПК от поверхности корневого апекса и в результате численность свободных ПК в гелевом чехле. Выявленные эффекты имеют дозо-зависимый характер и существенно отличаются для наночастиц размером 68 нм и 6,5 нм.

Еще одной эффекторной системой гуминовых наночастиц является окислительно-восстановительный гомеостаз: их биологиче-

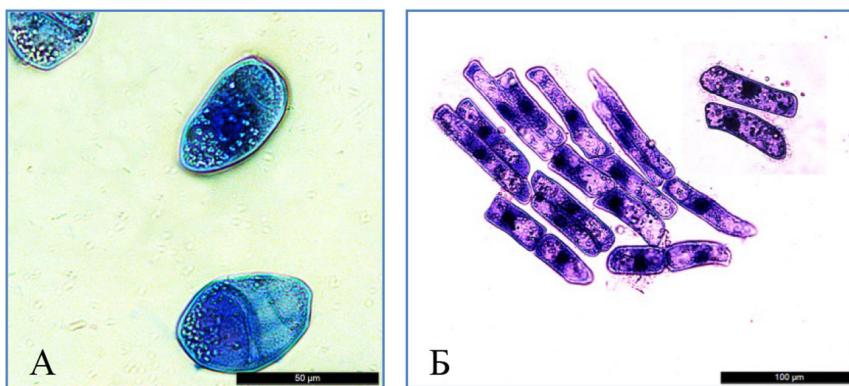


Рис. 8. Пограничные клетки в суспензии после активного смывания. А – одиночные овальные клетки с гранулами крахмала в цитоплазме. Масштабная линейка 50 мкм. Б – фрагментmonoслой из палочковидных клеток и две одиночные палочковидные клетки. Масштабная линейка 100 мкм

Fig. 8. Border cells in suspension after active rinsing. A – single oval cells with starch granules in the cytoplasm. Scale bar 50 μ m. Б – a fragment of a monolayer of rod-shaped cells and two single rod-shaped cells. Scale bar 100 μ m

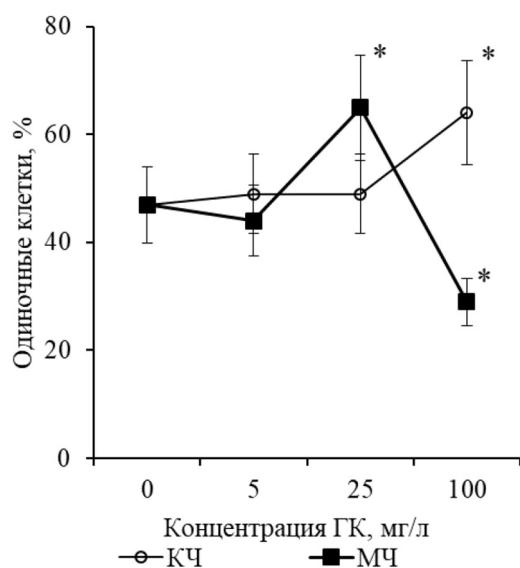


Рис. 9. Количество одиночных клеток в суспензии пограничных клеток. Активное смывание клеток с корневых апексов 2-дневных проростков. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ($p<0,05$). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 9. Number of single cells in border cell suspension. Active washing off of cells from root apices of 2-day-old seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ($p<0.05$). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

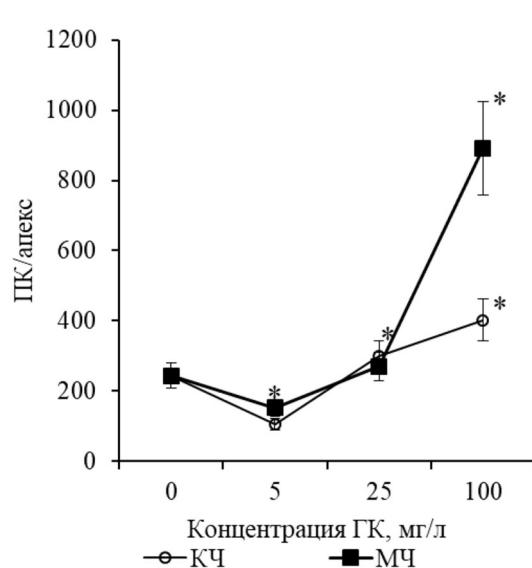


Рис. 10. Количество пограничных клеток в корневом апексе 2-дневных проростков пшеницы. Активное смывание клеток с корневых апексов. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ($p<0,05$). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 10. The number of border cells in the root apices of 2-day-old wheat seedlings. Active washing off of cells from root apices. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ($p<0.05$). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

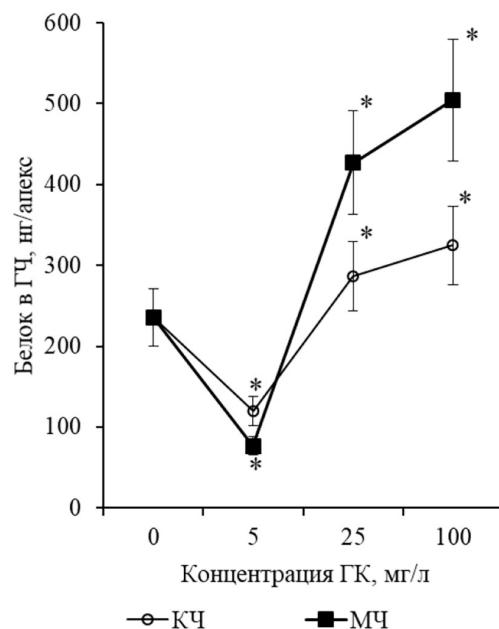


Рис. 11. Содержание белка (нг/апекс) в гелевом чехле корневого апекса 2-дневных проростков пшеницы. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ($p<0,05$). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 11. Protein content (ng/apex) in the mucilaginous sheath of the root apex of 2-day-old wheat seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ($p<0.05$). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

ская активность может реализоваться через индукцию мягкого окислительного стресса. В связи с этим на следующем этапе работы оценивали содержание карбонилированных белков (КБ), малонового диальдегида (МДА) и пролина (как маркеров окислительного стресса) в корнях 2-дневных проростков.

*Влияние гуминовых наночастиц на содержание МДА, карбонилированных белков и пролина в корнях 2-дневных проростков *T. aestivum**

При культивировании на средах с крупными наночастицами в концентрации 25 мг/л и 100 мг/л в корнях 2-суточных проростков содержание КБ значительно возрастало, соот-

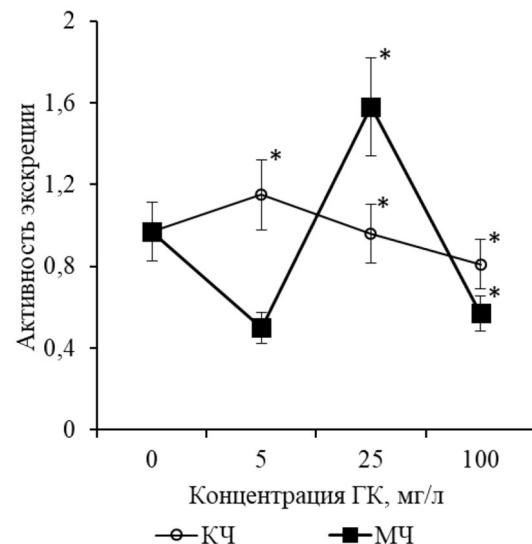


Рис. 12. Экскреторная активность пограничных клеток (ПК). Экскреторную активность оценивали как соотношение количества белка в гелевом чехле апекса и количества ПК на апекс. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ($p<0,05$). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 12. Excretory activity of border cells (BCs). Excretory activity was assessed as the ratio of the amount of protein in the mucilaginous sheath of the apex to the number of BCs per apex. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ($p<0.05$). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

ветственно, в 2 и 5 раз, по сравнению с контролем (рис. 13 б). Крупные наночастицы в изученных концентрациях не влияли на содержание МДА (рис. 13 а).

Сравнение динамики содержания КБ и МДА позволяет предположить, что на среде с крупными гуминовыми наночастицами значительная часть образующегося в корнях МДА включается в окислительные модификации белков, а ТБК-активный пул остается в пределах значений, характерных для контрольного варианта (рис. 13).

В отличие от крупных наночастиц, на среде с мелкими гуминовыми наночастицами (6,5 нм) содержание МДА в корнях

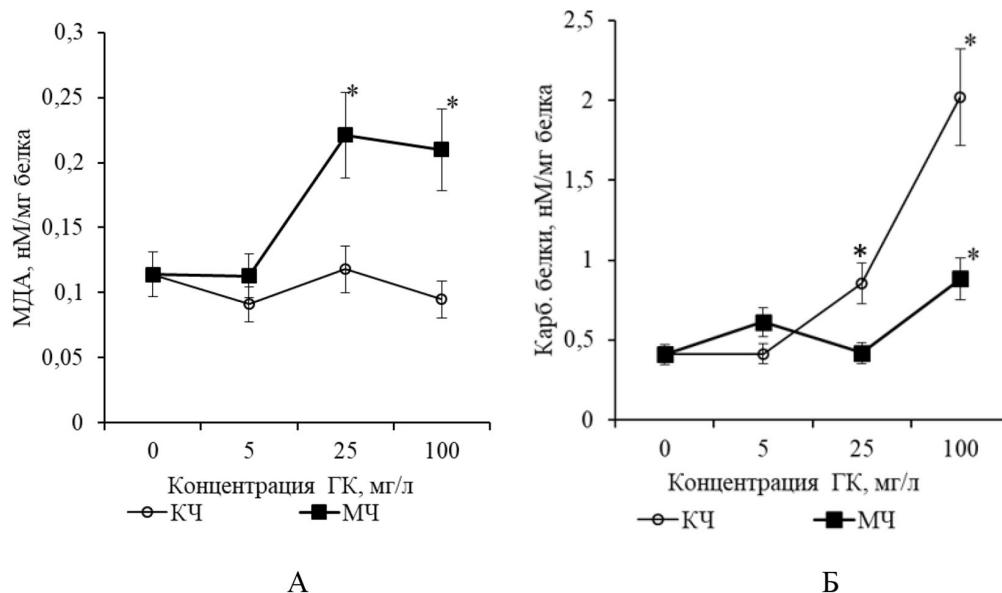


Рис. 13. Содержание МДА (А) и карбонилированных белков (Б) (нМ/мг белка) в корнях 2-дневных проростков пшеницы. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ($p<0,05$). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 13. The contents of MDA (A) and carbonylated proteins (B) (nM/mg of protein) in the roots of 2-day-old wheat seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ($p<0.05$). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

проростков увеличивалось в 2 раза (концентрации 25 мг/л и 100 мг/л). Увеличение содержания КБ в корнях было отмечено только для концентрации 100 мг/л (рис. 13).

Увеличение содержания КБ и МДА сопровождалось дозозависимым увеличением содержания пролина в корнях проростков при культивировании на среде и с мелкими, и крупными гуминовыми наночастицами (рис. 14).

Полученные результаты свидетельствуют, что в условиях гидропонной культуры гуминовые наночастицы индуцируют окислительный стресс в корнях 2-дневных проростков. Уровень продуктов свободнорадикального окисления белков и липидов зависит от концентрации и размера наночастиц. Следует отметить, что индуцированный гуминовыми наночастицами окислительный стресс не сопровождался ингибированием роста корней.

Обсуждение

В литературе эффекты ГК часто объясняют их влиянием на ризосферный метаболизм (García et al., 2016a; Olaetxea et al., 2015, 2016). Ризосфера, прикорневая зона, формируется в процессе корневой экскреции и играет важную роль в процессах адаптации развивающегося корня проростка и взрослого растения к различным биотическим и абиотическим факторам среды (De-la-Peña, Loyola-Vargas, 2014; Holz et al., 2018; Javed et al., 2018; Rekha et al., 2018; Preece et al., 2018).

Показано, что важнейшим структурно-функциональным элементом ризосферной системы являются ПК (Hawes et al., 1998, 2002, 2016 a, b). ПК представляют собой специфическую популяцию соматических метаболически активных клеток. На разных этапах дифференцировки ПК могут реализовать свои функции в условиях физического контакта

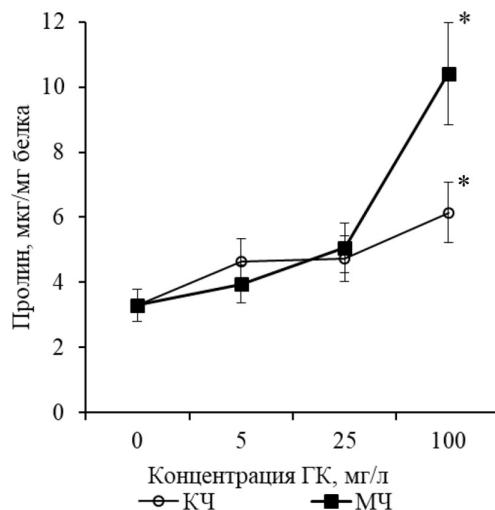


Рис. 14. Содержание пролина (мкг/мг белка) в корнях 2-дневных проростков пшеницы. Звездочкой отмечены значения, достоверно отличающиеся от контрольного варианта ($p<0,05$). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 14. Proline content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in the roots of 2-day-old wheat seedlings. Asterisks indicate values that are significantly different from the control ($p<0.05$). КЧ – larger humic nanoparticles; МЧ – smaller humic nanoparticles

с корневым апексом, а после утраты физического контакта с корневым апексом – в гелевом чехле, полисахаридно-гликопротеиновом матриксе, который окружает апекс и является продуктом экскреторной активности ПК. О возможности длительного автономного функционирования свидетельствуют многочисленные гранулы крахмала в цитоплазме ПК (рис. 8 а).

Гуминовые наночастицы увеличивали активность отделения ПК от поверхности корневого апекса и перехода в гелевый чехол (рис. 3). Отделение ПК связано с ремоделированием клеточных стенок. Известно, что в ремоделировании клеточных стенок участвуют не только ферменты (эндо-1,4-манназы, пектинмethylэстеразы, целлюлазы), но и активные формы кислорода (АФК): неферментативная окислительная модификация компонентов клеточной стенки вносит существенный вклад в разрыхление клеточных стенок на ранних этапах развития про-

ростка (Nonogaki et al., 2010; Scheler et al., 2015; Chen et al., 2016 a, b). Так как гуминовые наночастицы индуцировали окислительный стресс (повышали содержание КБ, МДА, пролина, рис. 13–14), можно полагать, что увеличение активности отделения ПК от поверхности корневого апекса в значительной степени связано с окислительным ремоделированием клеточных стенок. При этом следует отметить, что вклад АФК в процессы ремоделирования участков клеточных стенок, контактирующих с поверхностью корневого апекса, и участков клеточных стенок между самими ПК может быть различным. Так, гуминовые наночастицы увеличивали активность бокового отслаивания ПК от поверхности корневого апекса, но при этом сохранялись контакты ПК друг с другом (рис. 8).

На средах с гуминовыми наночастицами увеличивалась не только численность свободных ПК, но и размеры гелевого чехла (рис. 3). Динамика расчетного параметра ак-

тивности экскреции позволяет полагать, что увеличение размеров гелевого чехла связано не только с увеличением численности продуцентов (ПК), но и с увеличением экскреторной активности ПК (рис. 12). Известно, что ПК активно экскретируют в ризосферу более 100 различных белков (Knox et al., 2007; Wen et al., 2007). Возможно, что влияние гуминовых наночастиц на экскреторную активность ПК реализуется через индукцию окислительного стресса. Известно, что индукторы окислительного стресса увеличивают активность экскреции корневых экзометаболитов (UdDin et al., 2015; Javed et al., 2018).

Гуминовые наночастицы не стимулировали рост корней проростков, но индуцированное наночастицами формирование многочисленной популяции свободных ПК и активная экскреция экзометаболитов может способствовать быстрому становлению ризосферной системы и в результате обеспечивать быстрый рост и развитие корневой системы, ее устойчивость к различным биотическим и абиотическим факторам на более поздних этапах развития проростка.

Реализацию биологических эффектов ГК связывают с индукцией мягкого окислительного стресса: ГК увеличивают продукцию АФК в растительных клетках (García et al., 2016a, b). АФК-сигналинг, окислительная модификация белков, липидов и РНК играют важную роль на ранних этапах прорастания зерновки (Job et al., 2005; El-Maagouf-Bouteau et al., 2013; Oracz, Karpiński, 2016; Li et al., 2017). В прорастающей зерновке окислительная модификация белков увеличивает активность их протеолитической деградации в различных типах протеосомных систем и определяет доступность аминокислот для включения в синтез новых белков (Oracz, Stawska, 2016). Можно полагать, что активность окислительной модификации белков

в значительной степени определяет скорость изменений протеома проростка на ранних этапах его развития.

Гуминовые наночастицы способствовали дозозависимому увеличению содержания КБ (рис. 13 б). Опираясь на данные литературы, этот факт можно рассматривать как свидетельство более активного синтеза белков *de novo* в проростках при культивировании на средах с гуминовыми наночастицами.

Дозозависимое увеличение содержания МДА наблюдалось только для гуминовых наночастиц размером 6,5 нм (рис. 13 а). Уровень МДА является маркером структурно-функциональных перестроек мембранных систем клетки. Окислительные модификации липидов могут влиять на стабильность мембранных рафтов, плотность упаковки жирно-кислотных цепей и микровязкость мембраны (Conte et al., 2015; Neto, Cordeiro, 2016), индуцировать деформации липидного бислоя, образование пор и переход в мицеллярную фазу (Boonnoy et al., 2015). Эти структурные перестройки рассматриваются как регуляторные механизмы, определяющие активность мембраносвязанных процессов и функциональный статус клетки. Белковый синтез в значительной степени зависит от мембранных систем клетки и окислительные модификации мембранных липидов могут играть важную роль в активации синтеза белков *de novo* и перестройках протеома проростка при культивировании на средах с гуминовыми наночастицами.

Наряду с КБ и МДА, маркером индуцированного окислительного стресса в растительных клетках является содержание пролина. АФК являются медиаторами сигнальных систем, которые контролируют метаболизм пролина (Yang et al., 2009; Zhang, Becker, 2015; Copley et al., 2017). Пролин в условиях окислительного стресса «работает» как: а) хими-

ческий шаперон, стабилизирует белки и предотвращает их агрегацию (Samuel et al., 2000); б) молекулярный скавенджер АФК (Kaul et al., 2008; Signorelli et al., 2014); в) предотвращает истощение внутриклеточного пула глутатиона GSH (Hoque et al., 2008; Xu et al., 2009). Окисление 1 молекулы пролина в митохондриях приводит к образованию приблизительно 30 АТФ-эквивалентов (Hare, Cress, 1997; Cabassa-Hourton et al., 2016), которые используются для реализации компенсаторно-адаптивных перестроек метаболизма в условиях стресса. В связи с этим дозозависимое увеличение содержания пролина в корнях проростков при культивировании на средах с гуминовыми наночастицами (рис. 14) можно рассматривать как свидетельство перестроек энергетического метаболизма проростка: увеличения пула энергетических эквивалентов, которые могут использоваться для активного синтеза белков *de novo* (и других энергозависимых процессов).

С другой стороны, индуцированное гуминовыми наночастицами повышение уровня пролина может поддерживать активность окислительных модификаций белков и липидов на «регуляторном уровне» и предотвращать развитие деструктивных процессов.

Окисление пролина в митохондриях и образование АТФ-эквивалентов сопровождается образованием АФК и второй активацией процессов окислительной модификации белков и липидов и АФК-сигналинга (Garcia de la Garma et al., 2015). Этот феномен не позволяет оценить «величину» окислительного стресса, который вызывают сами гуминовые наночастицы.

Полученные результаты позволяют предполагать, что гуминовые наночастицы индуцируют глубокие перестройки метаболизма корня развивающегося проростка. Эти перестройки на более поздних этапах разви-

тия проростка могут реализоваться в выраженной стимуляции роста корневой системы и надземной части проростка.

В заключении следует отметить, что выявленные дозозависимые эффекты существенно различались для мелких и крупных наночастиц. Наночастицы размером 6,5 нм оказывали значительно более выраженное влияние на изученные параметры (рис. 13–14). При этом взаимоотношения между параметрами (соотношения Пролин/КБ, Пролин/МДА, КБ/МДА) значительно варьировали в зависимости от размеров наночастиц (рис. 15). Особенности динамики соотношений Пролин/КБ, Пролин/МДА, КБ/МДА позволяют предположить, что АФК-зависимый сигналинг может существенно различаться для гуминовых наночастиц разных размерных классов.

Известно, что биологические эффекты наночастиц в значительной степени зависят от размеров (Kulikova et al., 2017; Wang et al., 2018; Zheng et al., 2018). В целом мелкие наночастицы биологически более активны, чем крупные: уровень индуцированного окислительного стресса для мелких наночастиц выше, чем для крупных (Carlson et al., 2008; Makama et al., 2018). Предполагается, что способность гуминовых наночастиц индуцировать окислительный стресс в корневой системе связан с тем, что наночастицы могут временно «закупоривать» поровые комплексы в клеточных стенках и тем самым индуцировать дозозависимый окислительный стресс. Под влиянием корневых экзометаболитов происходит молекулярная дезинтеграция гуминовых наночастиц и поровые комплексы освобождаются (Piccolo, 2002; Olaetxea et al., 2015). Авторы не изучали зависимость окислительного стресса от размеров молекулярных агрегатов ГК, но можно предположить, что более мелкие частицы ГК «закупорива-

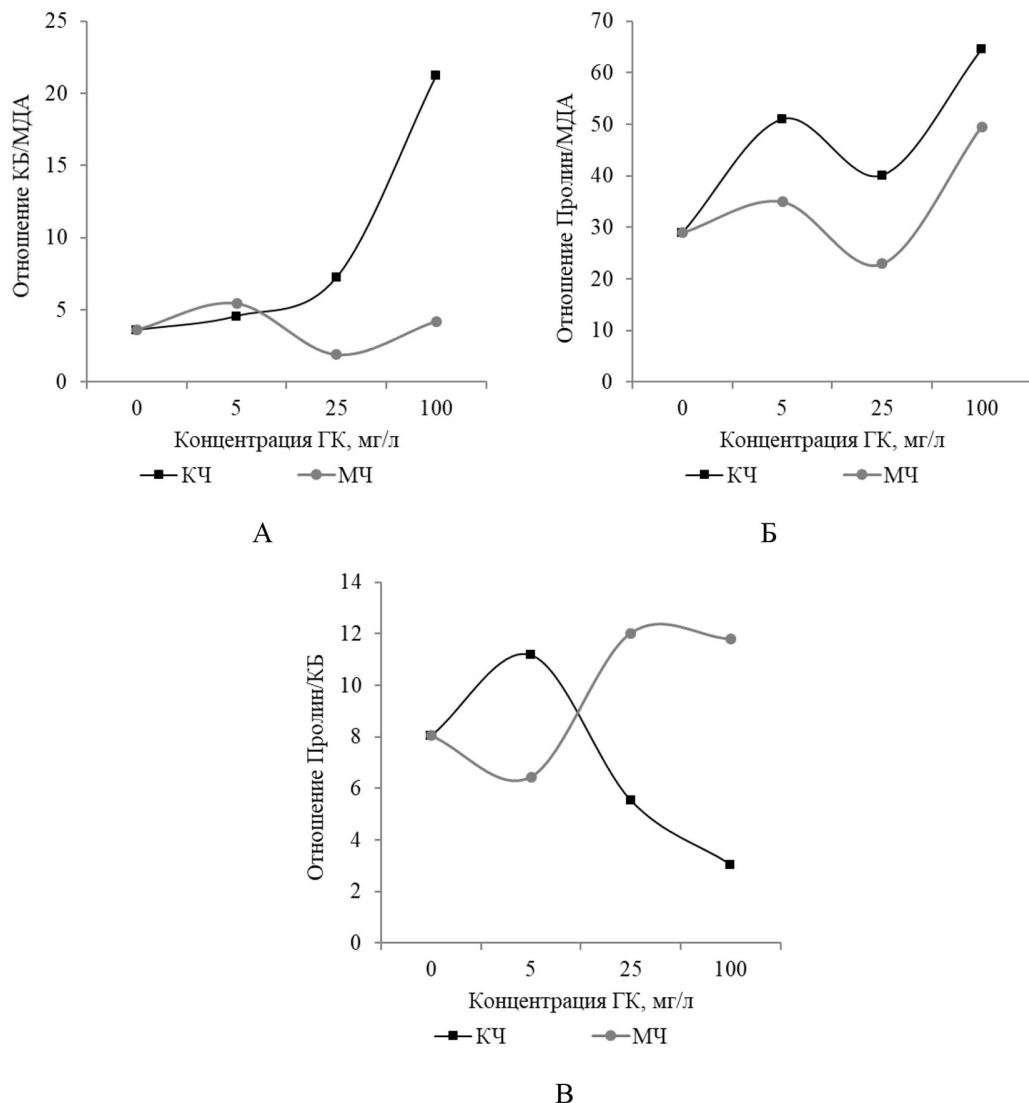


Рис. 15. Динамика соотношений между основными маркерами окислительного стресса (пролин, карбонилированные белки и МДА). КЧ – крупные гуминовые наночастицы, МЧ – мелкие гуминовые наночастицы

Fig. 15. Dynamics of proportions of the main markers of oxidative stress (proline, carbonylated proteins, and MDA). КЧ – larger humic nanoparticles, МЧ – smaller humic nanoparticles

ют» поровые комплексы на более длительное время и в результате индуцированный ими окислительный стресс будет выражен в большей степени, чем для более крупных частиц ГК.

Полученные результаты позволяют предполагать, что варьирование размеров гуминовых наночастиц может быть использовано

для целенаправленной регуляции их биологической активности в ризосфере на ранних этапах прорастания.

Заключение

Гуминовые наночастицы увеличивали численность популяции ПК корневого апекса 2-дневных проростков. Размеры гелевого

чехла и содержание общего белка в составе гелевого чехла корневого апекса 2-дневных проростков на средах с гуминовыми наночастицами значительно увеличивались. При проращивании на средах с гуминовыми наночастицами деструктивные изменения в корневом апексе 2-дневных проростков не выявлялись. Гуминовые наночастицы ин-

дуцировали окислительный стресс: в корнях 2-дневных проростков увеличивалось содержание КБ, МДА и пролина. Индуцированный гуминовыми наночастицами окислительный стресс не сопровождался ингибированием роста корня. Эффекты гуминовых наночастиц имели дозозависимый характер и существенно варьировали в зависимости от их размеров.

Список литературы / References

- Aguiar N.O., Novotny E.H., Oliveira A.L., Rumjanek V.M., Olivares F.L., Canellas L.P. (2013) Prediction of humic acids bioactivity using spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Geochemical Exploration*, 129: 95–102
- Bailly C., Benamar A., Corbineau F., Come D. (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. *Physiologia Plantarum*, 97(1): 104–110
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant & Soil*, 39(1): 205–207
- Boonnoy P., Jarerattanachat V., Karttunen M., Wong-ekkabut J. (2015) Bilayer deformation, pores, and micellation induced by oxidized lipids. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(24): 4884–4888
- Busato J.G., de Carvalho C.M., Zandonadi D.B., Sodré F.F., Ribeiro Mol A., Lima de Oliveira A., Navarro R.D. (2018) Recycling of wastes from fish beneficiation by composting: chemical characteristics of the compost and efficiency of their humic acids in stimulating the growth of lettuce. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(36): 35811–35820
- Cabassa-Hourton C., Schertl P., Bordenave-Jacquemin M., Saadallah K., Guivarc'h A., Lebreton S., Planchais S., Klodmann J., Eubel H., Crilat E., Lefebvre-De Vos D., Ghelis T., Richard L., Abdelly C., Carol P., Braun H.P., Savouré A. (2016) Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 473(17): 2623–2634
- Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L. K., Hess K.L., Jones R.L., Schlager J.J. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(43): 13608–13619
- Carty J.L., Bevan R., Waller H., Mistry N., Cooke M., Lunec J., Griffiths H.R. (2000) The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2): 729–735
- Chen B., Ma J., Xu Z., Wang X. (2016a) Abscisic acid and ethephon regulation of cellulase in the endosperm cap and radicle during lettuce seed germination. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(10): 859–869
- Chen B.X., Li W.Y., Gao Y.T., Chen Z.J., Zhang W.N., Liu Q.J., Chen Z., Liu J. (2016b) Involvement of polyamine oxidase-produced hydrogen peroxide during coleorhiza-limited germination of rice seeds. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1219

- Chen X., Kou M., Tang Z., Zhang A., Li H., Wei M. (2017) Responses of root physiological characteristics and yield of sweet potato to humic acid urea fertilizer. *PLoS One*, 12(12): e0189715
- Conte E., Bardi E., Losito I., Annese C., Ciminale F., Megli F.M. (2015) Does hydrogen bonding contribute to lipoperoxidation-dependent membrane fluidity variation? An EPR-spin labeling study. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1848(10): 2040–2049
- Copley T.R., Aliferis K.A., Kliebenstein D.J., Jabaji S.H. (2017) An integrated RNAseq-1H NMR metabolomics approach to understand soybean primary metabolism regulation in response to Rhizoctonia foliar blight disease. *BMC Plant Biology*, 17(1): 84
- De-la-Peña C., Loyola-Vargas V. M. (2014) Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. *Plant Physiology*, 166(2): 701–719
- El-Maarouf-Bouteau H., Meimoun P., Job C., Job D., Bailly C. (2013) Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4: 77
- García A. C., de Souza L. G., Pereira M. G., Castro R. N., García-Mina J. M., Zonta E., Lisboa F. J., Berbara R. L. (2016a) Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. *Scientific Reports*, 6: 20798
- García A. C., Olaetxea M., Santos L. A., Mora V., Baigorri R., Fuentes M., Zamarreño A. M., Berbara R. L., Garcia-Mina J. M. (2016b) Involvement of hormone- and ROS-signaling pathways in the beneficial action of humic substances on plants growing under normal and stressing conditions. *BioMed Research International*, 2016: 3747501
- Garcia de la Garma J., Fernandez-Garcia N., Bardisi E., Pallol B., Asensio-Rubio J. S., Bru R., Olmos E. (2015) New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system. *New Phytologist*, 205(1): 216–239
- Hare P. D., Cress W. A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21: 79–102
- Hawes M. C., Brigham L. A., Wen F., Woo H. H., Zhu Y. (1998) Function of root border cells in plant health: Pioneers in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 311–327
- Hawes M. C., Bengough G., Cassab G., Ponce G. (2002) Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4): 352–367
- Hawes M., Allen C., Turgeon B. G., Cullango-Rivera G., Minh Tran T., Huskey D. A., Xiong Z. (2016a) Root border cells and their role in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 143–161
- Hawes M. C., McLain J., Ramirez-Andreotta M., Cullango-Rivera G., Flores-Lara Y., Brigham L. A. (2016b) Extracellular trapping of soil contaminants by root border cells: New insights into plant defense. *Agronomy*, 6(1): 5
- Holz M., Zarebanadkouki M., Kuzyakov Y., Pausch J., Carminati A. (2018) Root hairs increase rhizosphere extension and carbon input to soil. *Annals of Botany*, 121(1): 61–69
- Hoque M. A., Banu M. N., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. (2008) Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 165(8): 813–824
- Javed M. T., Akram M. S., Habib N., Tanvir K., Ali Q., Niazi N. K., Gul H., Iqbal N. (2018) Deciphering the growth, organic acid exudations, and ionic homeostasis of Amaranthus viridis L. and Portulaca oleracea L. under lead chloride stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3): 2958–2971

- Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D. (2005) Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiology*, 138(2): 790–802
- Kaul S., Sharma S. S., Mehta I. K. (2008) Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids*, 34(2): 315–320
- Kesba H. H., El-Beltagi H. S. (2012) Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4): 287–293
- Knox O. G. G., Gupta V. V. S. R., Nehl D. B., Stiller W. N. (2007) Constitutive expression of Cry proteins in roots and border cells of transgenic cotton. *Euphytica*, 154(1–2): 83–90
- Kulikova N. A., Polyakov A. Y., Lebedev V. A., Abroskin D. P., Volkov D. S., Pankratov D. A., Klein O. I., Senik S. V., Sorkina T. A., Garshev A. V., Veligzhanin A. A., Garcia Mina J. M., Perminova I. V. (2017) Key roles of size and crystallinity of nanosized iron hydr(oxides) stabilized by humic substances in iron bioavailability to plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(51): 11157–11169
- Lamar R. T., Olk D. C., Mayhew L., Bloom P. R. (2014) A new standardized method for quantification of humic and fulvic acids in humic ores and commercial products. *Journal of AOAC International*, 97(3): 721–730
- Li W. Y., Chen B. X., Chen Z. J., Gao Y. T., Chen Z., Liu J. (2017) Reactive oxygen species generated by NADPH oxidases promote radicle protrusion and root elongation during rice seed germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1): 110
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275
- Makama S., Kloet S. K., Piella J., van den Berg H., de Ruijter N. C. A., Puntes V. F., Rietjens I. M. C. M., van den Brink N. W. (2018) Effects of systematic variation in size and surface coating of silver nanoparticles on their in vitro toxicity to macrophage RAW 264.7 cells. *Toxicological Sciences*, 162(1): 79–88
- Mora V., Olaetxea M., Bacaicoa E., Baigorri R., Fuentes M., Zamarreño A. M., Garcia-Mina J. M. (2014) Abiotic stress tolerance in plants: exploring the role of nitric oxide and humic substances. *Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology*. Khan M., Mobin M., Mohammad F., Corpas F. (eds.) Amsterdam, Springer Cham, p. 243–264
- Morozeski M., Bonomo M. M., Souza I. D. C., Rocha L. D., Duarte I. D., Martins I. O., Dobbss L. B., Carneiro M. T. W. D., Fernandes M. N., Matsumoto S. T. (2017) Effects of humic acids from landfill leachate on plants: An integrated approach using chemical, biochemical and cytogenetic analysis. *Chemosphere*, 184: 309–317
- Muscolo A., Sidari M., Attinà E., Francioso O., Tognoli V., Nardi S. (2007) Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal*, 71(1): 75–85
- Nagasawa K., Wang B., Nishiya K., Ushijima K., Zhu Q., Fukushima M., Ichijo T. (2016) Effects of humic acids derived from lignite and cattle manure on antioxidant enzymatic activities of barley root. *Journal of Environmental Science and Health – Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(2): 81–89
- Neto A. J. P., Cordeiro R. M. (2016) Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858(9): 2191–2198

- Nonogaki H., Bassel G. W., Bewley J. D. (2010) Germination—still a mystery. *Plant Science*, 179(6): 574–581
- Olaetxea M., Mora V., Bacaicoa E., Garnica M., Fuentes M., Casanova E., Zamarreño A. M., Iriarte J. C., Etayo D., Ederra I., Gonzalo R., Baigorri R., García-Mina J. M. (2015) Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids. *Plant Physiology*, 169(4): 2587–2596
- Olaetxea M., Mora V., García A. C., Santos L. A., Baigorri R., Fuentes M., Garnica M., Berbara R. L., Zamarreño A. M., Garcia-Mina J. M. (2016) Root-shoot signaling crosstalk involved in the shoot growth promoting action of rhizospheric humic acids. *Plant Signaling & Behavior*, 11(4): e1161878
- Ondrasek G., Rengel Z., Romic D. (2018) Humic acids decrease uptake and distribution of trace metals, but not the growth of radish exposed to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151: 55–61
- Oracz K., Karpiński S. (2016) Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Frontiers in Plant Science*, 7: 864
- Oracz K., Stawska M. (2016) Cellular recycling of proteins in seed dormancy alleviation and germination. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1128
- Piccolo A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75: 57–134
- Preece C., Farré-Armengol G., Llusia J., Peñuelas J. (2018) Thirsty tree roots exude more carbon. *Tree Physiology*, 38(5): 690–695
- Rekha K., Baskar B., Srinath S., Usha B. (2018) Plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* RR 4 isolated from rice rhizosphere induces malic acid biosynthesis in rice roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(1): 20–27
- Samuel D., Kumar T. K., Ganesh G., Jayaraman G., Yang P. W., Chang M. M., Trivedi V. D., Wang S. L., Hwang K. C., Chang D. K., Yu C. (2000) Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Science*, 9(2): 344–352
- Scheler C., Weitbrecht K., Pearce S. P., Hampstead A., Büttner-Mainik A., Lee K. J., Voegele A., Oracz K., Dekkers B. J., Wang X., Wood A. T., Bentsink L., King J. R., Knox J. P., Holdsworth M. J., Müller K., Leubner-Metzger G. (2015) Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiology*, 167(1): 200–215
- Signorelli S., Coitiño E. L., Borsani O., Monza J. (2014) Molecular mechanisms for the reaction between OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(1): 37–47
- Stevenson F. J. (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions. 2nd edition*. Wiley, 512 p.
- Tahiri A., Delporte F., Muhovalski Y., Ongena M., Thonart P., Druart P. (2016) Change in ATP-binding cassette B 1/19, glutamine synthetase and alcohol dehydrogenase gene expression during root elongation in *Betula pendula* Roth and *Alnus glutinosa* L. Gaertn in response to leachate and leonardite humic substances. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98: 25–38
- Taspinar M. S., Aydin M., Sigmaz B., Yildirim N., Agar G. (2017) Protective role of humic acids against picloram-induced genomic instability and DNA methylation in *Phaseolus vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(29): 22948–22953

- Trevisan S., Franciosi O., Quaggiotti S., Nardi S. (2010) Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6): 635–643
- UdDin I., Bano A., Masood S. (2015) Chromium toxicity tolerance of Solanum nigrum L. and Parthenium hysterophorus L. plants with reference to ion pattern, antioxidation activity and root exudation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113: 271–278
- Wang Y., Cui Y., Zhao Y., Zhao Q., He B., Zhang Q., Wang S. (2018) Effects of surface modification and size on oral drug delivery of mesoporous silica formulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 513: 736–747
- Wen F., VanEtten H. D., Tsaprailis G., Hawes M. C. (2007) Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant Physiology*, 143(2): 773–783
- Xu J., Yin H., Li X. (2009) Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, Solanum nigrum L. *Plant Cell Reports*, 28(2): 325–333
- Yang S. L., Lan S. S., Gong M. (2009) Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 166(15): 1694–1699
- Zhang L., Becker D. F. (2015) Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science*, 6: 552
- Zheng W., Xu Y. M., Wu D. D., Yao Y., Liang Z. L., Tan H. W., Lau A. T. Y. (2018) Acute and chronic cadmium telluride quantum dots-exposed human bronchial epithelial cells: The effects of particle sizes on their cytotoxicity and carcinogenicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1): 899–903

EDN: XFQNIG

УДК 574.5

Assessment of Anthropogenic Impact on the Yenisei River Anabanch within the City of Krasnoyarsk Based on Elemental Analysis of Macrophytes and Water

Yuliya D. Anishchenko^a,
Olesya V. Anishchenko^{a*}, Ivan V. Zuev^b,
Elena A. Ivanova^{a, b} and Anzhelika A. Kolmakova^a

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

^b*Siberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 25.03.2022, received in revised form 16.08.2022, accepted 12.10.2022

Abstract. The ‘Abakanskaya’ anabanch of the Yenisei River located in Krasnoyarsk is influenced by several anthropogenic factors (a dam in the upper reaches; heated water discharge from a thermal power plant; fish farming). The aim of the present work was to assess the anthropogenic impact on the lentic part of the Yenisei River in Krasnoyarsk based on elemental analysis of macrophytes and water. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) was used to determine the contents of macro- and trace elements in water and macrophytes. Results showed that Cu, Mn, Mo, and Al concentrations in water were higher than their MACs for fishery reservoirs, and specific conductivity and concentrations of B, Ba, Ca, Mg, Li, Na, Sr, and Mn in water exceeded their background values, which could be associated with the input of sewage and ground waters. The elevated concentration of Cu could be attributed to the input of that element with the heated waters of the thermal power plant, and increased concentrations of K and NO_2^- in water were probably caused by fish farming. Increased contents of Ba, Ca, Cu, Sr, and Zn in *Elodea canadensis* Michx. and Ca, Cu, Pb, Sr, and Li in *Myriophyllum* sp. were revealed at sites subjected to anthropogenic impact. The contents of metals in submerged macrophytes were indicative of the contamination of the ecosystem with Cu, Sr, Fe, Ni, and Zn. Three groups of macrophytes have been identified, differing in the contents of elements: *E. canadensis*, *Potamogeton*

© Siberian Federal University. All rights reserved

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

* Corresponding author E-mail address: hydrakr@rambler.ru

ORCID: 0000-0002-7438-0347 (Anishchenko Yu.); 0000-0002-1976-599X (Anishchenko O.); 0000-0002-0695-8936 (Zuev I.); 0000-0002-3220-103X (Ivanova E.); 0000-0003-4926-1212 (Kolmakova A.)

perfoliatus L.; *Myriophyllum* sp., *Stuckenia pectinata* (L.) Börner, *Ceratophyllum demersum* L.; and *Spirogyra* sp. These dissimilarities may be related to the morphological and physiological differences in the accumulation of essential (Mg, Zn, Fe, and V) and non-essential (As, Li, and Sr) elements by submerged macrophytes.

Keywords: heavy metals, nutrients, higher aquatic plants, *Spirogyra* sp., pollution indicators, river ecosystem.

Acknowledgments. The project «Development of scenarios for managing the recreational potential of the Abakanskaya branch of the Yenisei River in Krasnoyarsk based on monitoring of its ecological state and mathematical modeling» was funded by Krasnoyarsk Regional Fund of Science. The study was supported by Federal Tasks for Institute of Biophysics SB RAS No. 0287-2021-0019. The authors are grateful to Drobotov A.V., Ph.D., for providing the map of the study area.

Citation: Anishchenko Yu.D., Anishchenko O. V., Zuev I. V., Ivanova E. A., Kolmakova A. A. Assessment of anthropogenic impact on the Yenisei River anabanch within the city of Krasnoyarsk based on elemental analysis of macrophytes and water. *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2023, 16(1), 87–108. EDN: XFQNI.



Оценка антропогенного воздействия на экосистему р. Енисей в черте г. Красноярска на основе элементного анализа макрофитов и воды

Ю.Д. Анищенко^a, О.В. Анищенко^a,
И.В. Зуев^б, Е.А. Иванова^{а, б}, А.А. Колмакова^а

^aИнститут биофизики СО РАН
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Российская Федерация, Красноярск
^бСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Абаканская протока р. Енисей в черте г. Красноярска подвержена влиянию антропогенных факторов (дамба в верховьях, подогретые воды ТЭЦ, рыбоводное хозяйство). Цель работы – оценить антропогенное влияние на лентический участок реки Енисей в г. Красноярске на основе элементного анализа макрофитов и воды. С помощью атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) определено содержание макро- и микроэлементов в воде и макрофитах Абаканской протоки. В воде обнаружено превышение ПДК для рыбохозяйственных водоемов по Cu, Mn, Mo, Al и фоновых значений по минерализации, концентрации B, Ba, Ca, Mg, Li, Na, Sr, Mn, что могло быть связано с поступлением ливневых сточных и грунтовых вод; концентрации Cu, вероятно, поступающей с подогретыми водами ТЭЦ; концентрации K и NO₂⁻ в воде, вероятно, под воздействием рыбоводного хозяйства. Выявлено

увеличение содержания Ba, Ca, Cu, Sr, Zn в элодее, Ca, Cu, Pb, Sr, Li в урути на участках, подверженных антропогенному воздействию. Содержание металлов в погруженных макрофитах свидетельствовало о загрязнении экосистемы Cu, Sr, Fe, Ni и Zn. Выявлены три группы макрофитов, различающиеся по содержанию элементов: элодея (*Elodea canadensis* Michx.) и рдест стеблеобъемлющий (*Potamogeton perfoliatus* L.); уруть (*Myriophyllum* sp.), рдест гребенчатый (*Stuckenia pectinata* (L.) Börner), роголистник погруженный (*Ceratophyllum demersum* L.); спирогира (*Spirogyra* sp.). Отличия могут быть связаны с морфологическими и физиологическими особенностями аккумуляции эссенциальных (Mg, Zn, Fe и V) и неэссенциальных (As, Li, Sr) элементов погруженными макрофитами.

Ключевые слова: тяжелые металлы, биогенные элементы, высшая водная растительность, *Spirogyra* sp., индикаторы загрязнения, речная экосистема.

Благодарности. Проект «Разработка сценариев управления рекреационным потенциалом Абаканской протоки р. Енисей в г. Красноярске на основе мониторинга ее экологического состояния и математического моделирования» проведен при поддержке Красноярского краевого фонда науки. Работа поддержана Государственным заданием Института биофизики СО РАН № 0287-2021-0019. Авторы признательны к б.н. Дроботову А.В. за предоставленную карту-схему района исследования.

Цитирование: Анищенко, Ю.Д. Оценка антропогенного воздействия на экосистему р. Енисей в черте г. Красноярска на основе элементного анализа макрофитов и воды / Ю.Д. Анищенко, О.В. Анищенко, И.В. Зуев, Е.А. Иванова, А.А. Колмакова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 87–108. EDN: XFQNIG.

Введение

Загрязнение водных экосистем под влиянием деятельности человека остается одной из актуальных проблем в наши дни. Зарегулирование русла, сброс сточных вод промышленных предприятий, влияние аквакультуры часто приводят к ухудшению состояния речных экосистем, условий городской среды, утрате рекреационных качеств водными экосистемами. Для контроля состояния экосистем необходимо проводить мониторинговые исследования, позволяющие вовремя выявлять возникающие проблемы и управлять качеством природных вод.

В черте г. Красноярска расположена Абаканская протока р. Енисей, которая имеет важное рекреационное значение. Протока подвержена влиянию ряда антропогенных факто-

ров: верховье перекрыто дамбой, ниже дамбы поступают подогретые воды ТЭЦ и работает рыболовное хозяйство (Кравчук и др., 2021). Массовый рост макрофитов – высших водных растений и зеленой нитчатой макроводоросли спирогиры (*Spirogyra* sp.) – привел к ухудшению рекреационных и эстетических качеств на данном участке реки. С 2018 г. проводятся исследования влияния антропогенных факторов на экосистему Абаканской протоки. Известно, что макрофиты способны накапливать тяжелые металлы (ТМ) и биогенные элементы, поэтому используются в качестве индикаторов загрязнения водных экосистем (Rai, 2009; Rajfur et al., 2011). ТМ, обладая токсичностью, способны мигрировать и накапливаться в звеньях трофических цепей, в рыбе и представлять потенциальную опасность для здоровья человека

(Gladyshev et al., 2009), поэтому важна оценка загрязнения экосистемы данными элементами. Погруженные макрофиты, или гидрофиты, в большей степени накапливают металлы, чем другие группы водных растений (например, воздушно-водные или плавающие на поверхности), поскольку способны поглощать ионы всей поверхностью (Hassan et al., 2010). Таким образом, в рамках исследований Абаканской протоки нами проведена работа, целью которой было оценить антропогенное влияние на ленточный участок реки Енисей в г. Красноярске на основе элементного анализа макрофитов и воды. В задачи работы входило: 1) измерить содержание биогенных, макро- и микроэлементов в воде и макрофитах Абаканской протоки; 2) оценить степень загрязнения вод и видовую специфику накопления элементов погружен-

ными макрофитами на исследуемом участке р. Енисей.

Район и методы исследования

Подробное описание района исследований приведено в работе (Кравчук и др., 2021). Отбор проб воды и растений проводили в литорали в 2018 г. (23.07, 27.08) и в 2019 г. (28.05, 27.06, 23.07, 7.08, 27.08 и 10.09) на четырех станциях левого берега (рис. 1): станция 1 – в 50 м выше дамбы, фоновая; станция 2–200 м ниже дамбы; станция 3 – в районе поступления подогретых вод ТЭЦ; станция 4–500 м ниже рыбоводного хозяйства возле городского пляжа. В районе станции 3 пробы отбирали с обеих сторон насыпи, в связи с чем обозначили дополнительную станцию отбора проб макрофитов – 3А. Сбор водных

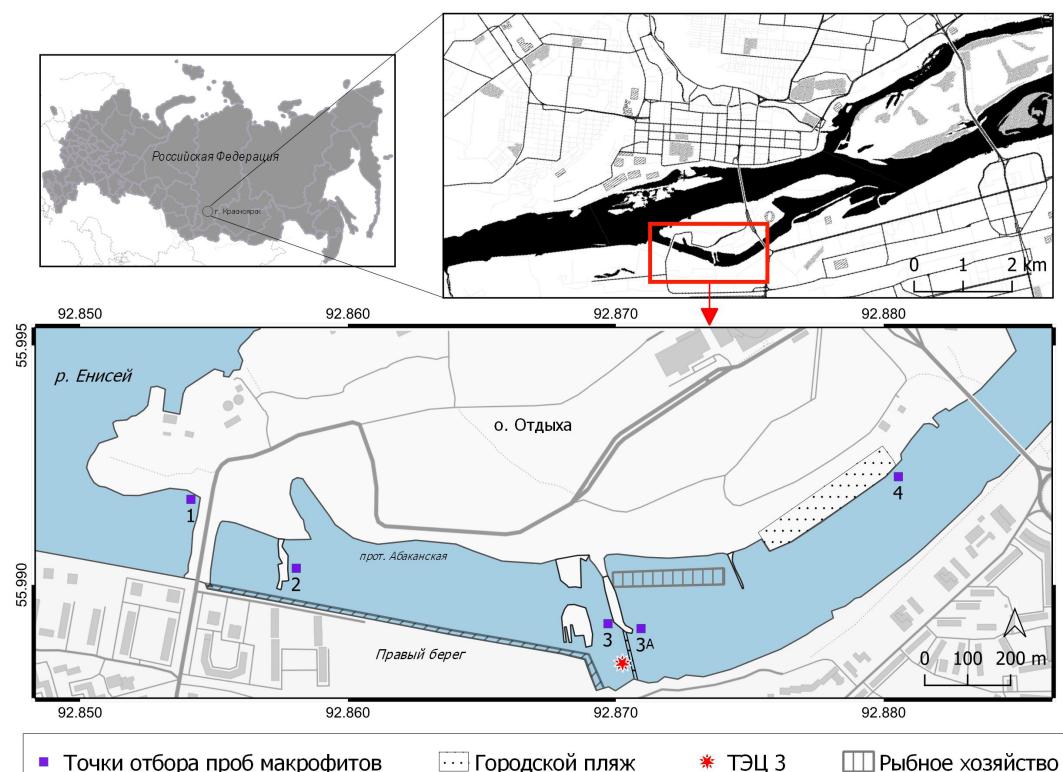


Рис. 1. Карта-схема Абаканской протоки р. Енисей

Fig. 1. Diagrammatic map of the 'Abakanskaya' anabranch of the Yenisei River

растений проводили у берега с глубины около 0,5 м в трех повторностях, биомассу срезали над грунтом с площади ограниченной рамкой размером 30x30 см (Катанская, 1981).

In situ измеряли температуру воды электронным термометром Long-Stem Thermometer, F/C, 8 (Cole-Parmer, США), содержание растворенного кислорода – кислородометром HI 9142 (Hanna Instruments, США). Воду зачерпывали пластиковым ведром. Пробы воды фильтровали через сеть с размером ячей 130 мкм. Отобранные пробы в течение часа транспортировали в лабораторию, где проводили измерение pH с помощью pH-метра PB-11 (Sartorius, Германия) и минерализации воды, удельной электропроводности (УЭП), кондуктометром Starter ST300C (Ohaus Instruments, Китай).

Концентрацию биогенных элементов определяли по общепринятым методикам: аммонийный азот – методом Несслера (ГОСТ 33045–2014); нитритный азот – колориметрически реакцией с сульфаниламидом и а-нафтиламином (реактив Грисса) (ГОСТ 33045–2014); нитратный азот – редукцией до нитритного на кадмиевой колонке (РД 52.24.380–2017); общий и минеральный фосфор анализировали фотометрически (РД 52.24.387–2006, РД 52.24.382–2006). Содержание общего азота в растениях определяли с помощью анализатора Flash 2000 NC Soil Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Германия) (Gladyshev et al., 2007), для этого отбирали по 10 мг образца. Содержание макро- и микроэлементов в воде и растениях определяли методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП) с помощью спектрометра iCAP 6300-Duo (Thermo Scientific, Англия). Пробы воды перед анализом на ИСП-спектрометре подкисляли концентрированной соляной кислотой (HCl) особой чистоты в соотношении 1:100. Подробное опи-

сание условий проведения измерений и характеристик спектрометра представлено в работе (Anishchenko et al., 2020). Пределы обнаружения метода приведены в табл. 1. Анализы воды и растений проводили в 2-х повторностях.

В лаборатории растения разделяли на виды, промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при 105 °C до постоянного веса. Затем пробы макрофитов измельчали с помощью кофемолки с общим объемом резервуара около 150 мл, при необходимости гомогенизировали дополнительно в агатовой ступке и высушивали до постоянного веса при 105 °C. По 0,2 г каждого образца растений помещали в контейнеры из фторопласта, добавляли 7 мл азотной кислоты (HNO₃) особой чистоты и минерализовали в микроволновой печи «МС-6» (ООО «Вольта», Санкт-Петербург) по программе: 1) температура – 150 °C, давление – 15 атм в течение 10 мин; 2) температура – 180 °C, давление – 20 атм в течение 5 мин. Контроль качества анализов проводили с использованием стандартного образца элодеи канадской (ЭК-1, ГСО № 8921–2007, Институт геохимии им. Виноградова СО РАН, Иркутск). Воспроизводимость результатов анализа растительных образцов представлена в табл. 1.

Всего было проанализировано 27 проб элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.), 30 – роголистника погруженного (*Ceratophyllum demersum* L.), 33 пробы урути (*Myriophyllum* sp.), 5 проб рдеста гребенчатого (*Stuckenia pectinata* (L.) Börner синоним *Potamogeton pectinatus* L.) и 8 проб рдеста стеблеобъемлющего (*Potamogeton perfoliatus* L.). Кроме высшей водной растительности было проанализировано 28 проб перифитонной зеленой нитчатой водоросли *Spirogyra* sp. со станций № 2–4. Подробное описание растительного сообщества исследуемого участка приведено в работе (Кравчук и др., 2021).

Таблица 1. Пределы обнаружения метода и результаты воспроизводимости анализа (%), полученные с использованием ГСО элодеи канадской (ЭК-1) («-» – измерения не проводились, «н.а.» – значения не аттестованы)

Table 1. Method detection limits and results of reproducibility of analysis (%) obtained using SRM (Elodea Canadensis, EC-1) (“-” – measurements were not carried out, “н.а.” – the values were not certified)

Элемент	λ , нм	Вода, мг/л	Макрофиты, мг/кг	Воспроизводимость, %
Al	396,152	0,0002	-	-
	394,401	-	3,5	65,1
As	189,042	0,001	0,35	85,5
B	249,678	0,0003	0,105	79,1
Be	234,861	0,00002	-	н.а.
Ba	455,403	0,000006	0,0021	84,6
Bi	223,061	0,0008	-	н.а.
Ca	317,933	0,004	0,002	101,5
Cd	214,438	0,00009	-	-
	228,802	-	0,105	125
Co	228,616	0,0002	0,07	80,7
Cr	267,716	0,0002	0,07	94,1
Cu	324,754	0,0001	0,032	94,4
Fe	259,940	-	0,7	94,6
	238,204	0,0001	-	-
Ga	417,206	0,0004	-	н.а.
K	769,896	0,03	7	89
Li	670,784	0,000005	0,0014	133,7
Mg	279,079	0,04	10,5	92,6
Mn	257,610	0,00003	0,14	104,3
Mo	202,030	0,0003	0,14	115,8
Na	589,592	0,005	1,05	94,5
Ni	231,604	0,0005	0,175	165,3
P	213,618	0,002	-	81,2
	214,914	-	7	-
Pb	220,353	0,001	0,35	168,9
S	180,731	-	105	83,2
	182,034	0,6	-	-
Sb	206,833	0,0009	-	-
Sr	421,552	0,000005	0,025	96,4
Ti	334,941	-	-	-
	337,280	0,00008	-	-
Tl	190,856	0,0009	-	-
V	268,796	0,0002	-	-
	292,402	-	0,035	66,8
Zn	213,856	0,0001	0,035	110,4

Поскольку в большинстве случаев тип распределения исследованных элементов был отличен от нормального (по критерию Шапиро-Уилка), для сравнения их средних величин применяли непараметрический тест Краскела-Уоллиса. Последующий *post-hoc* анализ проведен тестом Данна. Линейный дискриминантный анализ был проведен на основе первичной матрицы данных о содержании металлов в пробах изученных видов макрофитов. В качестве меры дискриминации видов по каждому из элементов использованы стандартизированные коэффициенты 1 и 2 дискриминантных функций. Все статистические расчеты выполняли в среде R (R Development Core Team, 2011), с использованием пакетов “multcompView”, “FSA”, “MASS”.

Результаты

Вода в районе исследования характеризовалась как слабощелочная и щелочная (Никаноров, 1989), значение pH варьировало в среднем от 8,13 (на ст. № 2, 3) до 8,63 (на ст. № 4) и было статистически значимо ниже на ст. № 2, чем на ст. № 4 (табл. 2). На ст. № 4 pH превышало рекомендованный норматив для рыбохозяйственных водоемов (Об утверждении..., 2016), устанавливаемый по фоновым значениям, т.е. 8,19 для ст. № 1. По концентрации растворенного минерального фосфора вода относилась к олиготрофному типу (Об утверждении..., 2016). Концентрация В, Са, Mg, УЭП в воде на ст. № 2 и № 4, Ва, Mn на ст. № 2, Li, Na, Sr на ст. № 2–4, Cu на ст. № 3, K, NO_2^- на ст. № 4 было достоверно выше, чем на фоновом участке (ст. № 1) (табл. 2). Температура воды на 3-й и 4-й станциях достоверно превышала значения данного показателя на 1-й и 2-й станциях, а также была выше установленного норматива (увеличение температуры до 20 °C в летний период) для

водоемов, где обитают холодолюбивые рыбы. На ст. № 2 и № 3 отмечено достоверное снижение содержания кислорода в воде. Обнаружено превышение в воде ПДК для рыбохозяйственных водоемов (Об утверждении..., 2016) по общему содержанию Al (в 1,25–1,5 раза) на ст. № 1 и № 3, Cu (в 2–4 раза) и Mo (в 1,1–1,9 раза) на всех станциях, Mn (в 1,7 раза) на ст. № 2 (табл. 2).

Содержание элементов в пробах макрофитов на условно фоновом участке удалось определить в достаточном для статистического анализа количестве проб для двух видов – элодеи ($n = 6$) и урути ($n = 4$) (табл. 3, 4). В пробах элодеи на ст. № 1 содержание K, P, Na, В было достоверно выше, чем на станциях № 3А и 4, и N, чем на ст. № 4. Содержание Cd на ст. № 4 в образцах элодеи было достоверно ниже, чем на станциях № 1 и № 3. Содержание Ва в пробах элодеи (табл. 3) было достоверно выше на станциях № 2, 3А и 4, чем на фоновом участке. Содержание As в пробах элодеи на ст. № 2 достоверно превышало таковое на № 3А. В пробах урути отмечено достоверно более высокое содержание В и Cd на условно фоновом участке, по сравнению со станцией № 4 (табл. 4). Содержание Cu и Zn в пробах элодеи и Си в урути достоверно увеличивалось на ст. № 3 и № 3А, по сравнению с фоном. Содержание Sr в образцах элодеи на ст. № 3А и в урути на ст. № 2 и № 3 достоверно превышало фоновые значения. Уруть на ст. № 3 и № 3А содержала достоверно больше Pb, по сравнению с фоновым участком. Содержание Са в пробах элодеи на ст. № 3А и в урути на ст. № 2 было достоверно выше, чем на ст. № 1. Уруть на ст. № 4 содержала достоверно больше Li, чем на фоновом участке. В урути содержание Na, Ni на ст. № 3А, N на ст. № 3А и № 4, Zn на ст. № 3 и № 3А было достоверно выше, чем на ст. № 2. В пробах роголистника достоверно более высокое содержание Cd, Cu,

Таблица 2. Содержание элементов (мг/л) и основные характеристики воды (среднее ± стандартная ошибка, $n = 8$ – число проб) на станциях отбора проб (№ 1–4) в Абаканской протоке р. Енисей (2018 г. (июль – август), 2019 г. (май – сентябрь)) в сравнении с ПДК для рыбохозяйственных водоемов («–» – не указано в перечне) (Об утверждении..., 2016). Одноковыми буквами отмечены средние, между которыми отличия статистически не достоверны по критерию Краскела-Уоллиса. Жирным шрифтом выделены значения, превышающие ПДК для рыбохозяйственных водоемов

Table 2. Element contents (mg·L⁻¹) and main characteristics of water (Mean ± SE, $n = 8$ – number of samples) in the Abakanskaya anabanch of the Yenisei River (2018, July – August, 2019, May – September) compared with the MACs for water bodies of fishery significance («–» – limits are not indicated) (The Ministry of Agriculture..., 2016). The same letters denote means that are not significantly different based on Kruskal-Wallis test. Values in bold type exceed the MAC

Показатель	Станция				Р	ПДК
	1	2	3	4		
1	2	3	4	5	6	7
Al	^{ab} 0,0536±0,0201	^a 0,0175±0,0032	^b 0,0600±0,0114	^{ab} 0,0253±0,0048	<0,05	0,04
As	0,0001±0,0001	0,00001±0,00001	0,0001±0,0001	0,0001±0,0001	>0,05	0,05
B	^a 0,0037±0,0005	^b 0,0050±0,0005	^{ab} 0,0047±0,0004	^b 0,0056±0,0004	<0,05	0,50
Ba	^a 0,01683±0,00062	^b 0,02153±0,00116	^{ab} 0,02031±0,00123	^{ab} 0,01956±0,00191	<0,05	0,74
Bi	0,0001±0,0001	0,0003±0,0001	0,0004±0,0001	0,0003±0,0001	>0,05	-
Ca	^a 24,230±0,554	^b 30,349±0,825	^{ac} 25,679±0,776	^{bc} 27,512±0,757	<0,05	180
Cd	h.o.	h.o.	0,00001±0,00001	h.o.	>0,05	0,005
Co	0,00009±0,00003	0,00009±0,00003	0,00010±0,00005	0,00006±0,00003	>0,05	0,01
Cr	0,0004±0,0001	0,0003±0,00004	0,0004±0,0001	0,0003±0,0001	>0,05	0,02
Cu	^{ab} 0,0021±0,0003	^a 0,0017±0,0004	^c 0,0044±0,0004	^{bc} 0,0035±0,0005	<0,05	0,001
Fe	0,0840±0,0272	0,0433±0,0043	0,0814±0,0139	0,0451±0,0054	>0,05	0,1
Ga	0,0002±0,00006	0,00021±0,00003	0,00025±0,00011	0,00028±0,00006	>0,05	-
K	^a 0,56140±0,0272	^{ab} 0,6805±0,0353	^{ab} 0,6450±0,0270	^b 0,7524±0,0533	<0,05	50
Li	^a 0,00115±0,00005	^b 0,00188±0,00018	^{bc} 0,00234±0,00009	^c 0,01117±0,00242	<0,05	0,08
Mg	^a 4,12±0,11	^b 4,94±0,10	^{ac} 4,22±0,09	^{bc} 4,64±0,13	<0,05	40
Mn	^a 0,00811±0,00127	^b 0,01679±0,00181	^a 0,00900±0,00119	^a 0,00675±0,00118	<0,05	0,01
Mo	0,0012±0,0006	0,0013±0,0003	0,0019±0,0012	0,0011±0,0003	>0,05	0,001
Na	^a 2,303±0,047	^b 3,131±0,178	^b 3,816±0,565	^b 3,869±0,387	<0,05	120
Ni	0,0008±0,0004	0,0003±0,0001	0,0003±0,0001	0,0005±0,0002	>0,05	0,01
Pb	0,0005±0,0003	0,0001±0,0001	0,0006±0,0003	0,0005±0,0002	>0,05	0,006
S	2,3±0,3	2,7±0,3	2,9±0,3	3,0±0,3	>0,05	-
Sb	0,0003±0,0001	0,0004±0,0001	0,0005±0,0001	0,0003±0,0002	>0,05	-
Sr	^a 0,14645±0,00298	^b 0,17691±0,00466	^b 0,17813±0,00721	^b 0,19249±0,01045	<0,05	0,4
Ti	^a 0,00164±0,00059	^b 0,00039±0,00017	^{ab} 0,00146±0,00029	^{ab} 0,00044±0,00013	<0,05	0,06
Tl	0,00001±0,00001	h.o.	0,00009±0,00009	0,00003±0,00003	>0,05	-
V	0,0008±0,0001	0,0006±0,0001	0,0009±0,0002	0,0009±0,0001	>0,05	0,001
Zn	0,0032±0,0015	0,0018±0,0011	0,0048±0,0019	0,0020±0,0005	>0,05	0,01
P-PO ₄	0,004±0,002	0,001±0,001	0,004±0,001	0,004±0,001	>0,05	0,05
Р общ	^{ab} 0,008±0,001	^a 0,006±0,001	^{ab} 0,014±0,006	^b 0,013±0,002	<0,05	-
NH ₄ ⁺	0,064±0,011	0,051±0,006	0,066±0,007	0,096±0,019	>0,05	0,5
NO ₂ ⁻	^a 0,0056±0,0011	^a 0,0067±0,0009	^{ab} 0,0221±0,0129	^b 0,0599±0,0127	<0,05	0,08
NO ₃ ⁻	0,196±0,060	0,218±0,069	0,201±0,055	0,213±0,045	>0,05	40
pH	^{ab} 8,19±0,06	^a 8,13±0,09	^{ab} 8,13±0,08	^b 8,63±0,15	<0,05	8,19
t, °C	^a 13,35±0,85	^a 15,41±1,13	^b 22,23±1,02	^b 21,86±1,17	<0,05	20

Продолжение табл. 2

Continuation of the Table 2

1	2	3	4	5	6	7
O ₂ , мг/л	^a 10,81±0,16	^b 9,31±0,33	^b 9,63±0,12	^a 12,37±0,97	<0,05	6
УЭП, мкСм/см	^a 167,68±3,28	^b 202,01±4,03	^{ac} 179,14±5,14	^b c192,1±3,08	<0,05	-

Таблица 3. Содержание элементов (среднее ± стандартная ошибка, мг/кг, *г/кг сухого веса) в пробах элодеи канадской (*E. canadensis*) Абаканской протоки р. Енисей (жирным шрифтом отмечены максимальные значения; *n* – количество проанализированных проб; «н.д.» – данные отсутствуют; одинаковыми буквами отмечены данные, между которыми нет достоверных отличий по тесту Краскела-Уоллиса, буквы отсутствуют – данный тест не выявил достоверных отличий)

Table 3. Element contents (Mean ± SE, mg·kg⁻¹, *g·kg⁻¹ dry weight) in the samples of *E. canadensis* in the Abakanskaya anabanch of the Yenisei River (maximum values are marked in bold; *n* – the number of analyzed samples; “н.д.” – no data; the same letters denote means that are not significantly different based on Kruskal-Wallis test; no letters means that the test is not significant)

	Станции					P
	1 (n = 6)	2 (n=3)	3 (n=5)	3A (n=7)	4 (n=6)	
Al*	0,751±0,076	1,059±0,373	1,024±0,476	0,921±0,290	2,221±0,590	>0,05
Ca*	^a 21,683±3,230	^{ab} 27,055±2,003	^{ab} 60,934±14,954	^b89,035±6,585	^{ab} 42,908±10,515	<0,05
Fe*	1,146±0,127	3,818±0,363	1,793±0,696	1,467±0,439	5,334±1,639	>0,05
K *	^a39,362±1,967	^{ab} 29,752±2,326	^{ab} 27,974±3,132	^b 16,610±1,828	^b 17,004±3,088	<0,05
Mg*	2,400±0,014	2,660±0,258	2,678±0,233	2,551±0,106	2,767±0,464	>0,05
P*	^a5,791±0,378	^{ab} 3,375±0,649	^{ab} 2,395±0,262	^b 1,578±0,203	^b 1,412±0,255	<0,05
Na*	^a9,264±0,471	^{ab} 8,415±1,980	^{abc} 4,689±0,584	^c 2,914±0,271	^{bc} 3,227±0,718	<0,05
S*	3,145±0,326	4,061±0,698	3,261±0,146	2,946±0,204	2,469±0,385	>0,05
N*	^a41,88±1,21	н.д.	^{ab} 36,94±1,10	н.д.	^b 26,02±0,16	<0,01
As	^{ab} 1,55±0,08	^a3,99±0,96	^{ab} 1,15±0,38	^b 0,93±0,20	^{ab} 1,20±0,47	<0,05
B	^a14,42±1,71	^{ab} 11,74±1,02	^{ab} 9,86±0,84	^b 7,41±0,43	^b 6,79±1,38	<0,05
Ba	^a 48,73±3,43	^b139,8±17,23	^{ab} 85,78±8,09	^b 100,45±5,91	^b 125,62±27,65	<0,05
Cd	^a 0,55±0,05	^{ab} 0,41±0,12	^a0,58±0,07	^{ab} 0,45±0,06	^b 0,23±0,05	<0,05
Co	2,11±0,38	3,75±0,49	2,00±0,24	1,40±0,26	3,03±0,81	>0,05
Cr	3,72±0,8	4,05±1,19	4,12±1,47	3,07±1,51	32,65±16,03	>0,05
Cu	^a 7,41±0,7	^a 6,29±0,96	^b45,79±2,89	^b 44,96±4,81	^{ab} 23,53±4,22	<0,05
Li	1,40±0,11	1,55±0,37	2,15±0,73	1,99±0,33	6,60±1,73	>0,05
Mn	597,08±100,89	4825,39±1507,2	699,96±123,28	557,94±114,65	466,69±60,64	>0,05
Mo	0,46±0,05	0,63±0,18	0,70±0,05	0,75±0,06	0,70±0,18	>0,05
Ni	8,00±0,97	10,24±1,53	12,55±1,88	15,25±2,34	19,74±5,96	>0,05
Pb	0,78±0,19	0,60±0,49	1,68±0,91	3,09±1,60	3,67±1,82	>0,05
Sr	^a 122,97±11,07	^a 135,55±12,64	^{ab} 273,31±58,33	^b358,42±23,76	^{ab} 183,20±41,91	<0,05
V	2,05±0,29	4,41±0,83	2,70±1,25	2,76±0,89	7,83±2,26	>0,05
Zn	^a 43,89±2,44	^a 38,23±3,79	^b 101,81±11,38	^b108,16±18,42	^{ab} 54,31±9,42	<0,05

Таблица 4. Содержание элементов (среднее \pm стандартная ошибка, мг/кг, * г/кг сухого веса) в пробах урути (*Myriophyllum* sp.) Абаканской протоки р. Енисей («н.о.» – ниже предела обнаружения, остальные обозначения как в табл. 3). Жирным шрифтом отмечены максимальные значения

Table 4. Element contents (Mean \pm SE, mg·kg⁻¹, * g·kg⁻¹ dry weight) in *Myriophyllum* sp. in the Abakanskaya anabanch of the Yenisei River («н.о.» – below detection limit, other designations are as in Table 3). The maximum values are marked in bold

	Станции					P
	1 (n=4)	2 (n=8)	3 (n=8)	3A (n=5)	4 (n=8)	
Al*	0,981 \pm 0,298	1,118 \pm 0,257	2,236\pm0,496	2,136 \pm 1,265	2,104 \pm 0,354	$>0,05$
Fe*	2,152 \pm 0,623	2,414 \pm 0,731	3,264 \pm 0,728	2,985 \pm 1,562	3,882\pm0,678	$>0,05$
Ca*	^a 11,288 \pm 0,950	^b 59,937 \pm 10,531	^a 26,139 \pm 7,571	^{ab} 23,427 \pm 2,112	^a 19,422 \pm 1,589	$<0,05$
K*	13,583 \pm 3,200	14,024 \pm 2,541	12,369 \pm 1,155	20,337\pm4,256	10,451 \pm 1,758	$>0,05$
Mg*	3,043 \pm 0,508	2,694 \pm 0,141	2,749 \pm 0,286	4,309\pm0,932	3,205 \pm 0,554	$>0,05$
Na*	^{ab} 7,566 \pm 1,278	^a 4,467 \pm 0,356	^{ab} 6,574 \pm 1,255	^b 9,433 \pm 1,489	^{ab} 5,693 \pm 0,565	$<0,05$
P*	2,434\pm0,301	1,495 \pm 0,243	1,714 \pm 0,165	1,540 \pm 0,268	1,663 \pm 0,139	$>0,05$
S*	3,305 \pm 0,239	2,933 \pm 0,346	3,061 \pm 0,132	3,312 \pm 0,371	3,465\pm0,296	$>0,05$
N*	н.д.	^a 20,45 \pm 1,80	^{abc} 29,21 \pm 2,62	^{bc} 29,38 \pm 2,06	^c 29,45 \pm 1,39	$<0,05$
As	2,75\pm0,67	2,44 \pm 0,68	1,67 \pm 0,27	1,35 \pm 0,32	1,99 \pm 0,11	$>0,05$
B	^a 15,25 \pm 2,48	^{ab} 9,89 \pm 0,37	^{ab} 12,69 \pm 1,42	^{ab} 12,56 \pm 0,89	^b 10,09 \pm 1,08	$<0,05$
Ba	61,99 \pm 16,16	80,26 \pm 10,50	61,67 \pm 5,50	63,52 \pm 5,64	118,95\pm21,37	$>0,05$
Cd	^{ab} 0,81 \pm 0,20	^{ac} 0,32 \pm 0,03	^{abc} 0,62 \pm 0,14	^b 0,69 \pm 0,04	^c 0,28 \pm 0,06	$<0,05$
Co	3,63\pm1,18	1,58 \pm 0,37	2,15 \pm 0,28	3,03 \pm 0,88	2,44 \pm 0,50	$>0,05$
Cr	2,95 \pm 0,81	4,49 \pm 0,91	7,43 \pm 1,32	11,00\pm6,92	6,88 \pm 1,13	$>0,05$
Cu	^a 9,42 \pm 2,25	^a 6,10 \pm 0,92	^b 38,60 \pm 5,07	45,41\pm4,63	^{ab} 19,68 \pm 0,93	$<0,05$
Li	^a 0,94 \pm 0,29	^{ab} 1,87 \pm 0,38	^{ab} 2,83 \pm 0,66	^{ab} 2,91 \pm 1,49	^b 4,25 \pm 0,74	$<0,05$
Mn	1944,81\pm622,47	1186,37 \pm 231,01	560,11 \pm 34,19	880,29 \pm 212,57	749,72 \pm 72,07	$>0,05$
Mo	0,51 \pm 0,12	0,59\pm0,11	0,52 \pm 0,07	0,51 \pm 0,09	0,48 \pm 0,07	$>0,05$
Ni	^{ab} 9,20 \pm 1,15	^a 5,18 \pm 0,77	^{ab} 8,82 \pm 1,47	17,77\pm3,36	^{ab} 8,03 \pm 0,75	$<0,05$
Pb	^a н.о.	^{ab} 1,07 \pm 0,45	^b 3,46 \pm 0,85	3,97\pm0,98	^{ab} 3,23 \pm 0,87	$<0,05$
Sr	^a 82,65 \pm 8,95	172,19\pm13,47	^b 170,94 \pm 21,00	^{ab} 162,21 \pm 16,85	^{ab} 117,12 \pm 13,07	$<0,05$
V	4,10 \pm 1,43	3,69 \pm 0,83	5,64 \pm 1,17	4,76 \pm 2,54	6,70\pm1,37	$>0,05$
Zn	^{abc} 61,51 \pm 4,40	^a 24,39 \pm 3,98	^{bc} 90,07 \pm 7,98	164,37\pm35,04	^{ac} 55,69 \pm 1,67	$<0,05$

Pb, Zn обнаружено на ст. № 3 и № 3A, Ni на ст. № 3A, чем на ст. № 4 (табл. 5). В пробах спирогиры отмечено увеличение содержания Li, V, Al, Mg, Cr на ст. № 4, Cu и P на ст. № 3 и № 3A, Cr на ст. № 3, по сравнению со станцией № 2. В пробах спирогиры на ст. № 3 и № 3A содержание Na было достоверно ниже, чем на ст. № 2 и № 4, содержание Ba – ниже чем на ст. № 2 (табл. 6).

Максимальное содержание большинства элементов обнаружено в пробах спирогиры, при сравнении с исследованными видами высшей водной растительности на ст. № 4 (рис. 2). В пробах спирогиры отмечено достоверно более высокое содержание Al, Fe, Ba, Li, Pb, Sr, V, Co, Cr, Ca, чем в роголистнике, Ni, Cr, Mg, чем в урути, Co и Ni, чем в рдесте стеблевом, Mn, чем в рдесте гребенчатом,

Таблица 5. Содержание элементов (среднее \pm стандартная ошибка, мг/кг, $^* \text{г/кг}$ сухого веса) в пробах роголистника погруженного (*C. demersum*) Абаканской протоки р. Енисей. Жирным шрифтом отмечены максимальные значения, обозначения как в табл. 3

Table 5. Element contents (Mean \pm SE, mg·kg⁻¹, $^* \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry weight) in the samples of *C. demersum* in the Abakanskaya anabanch of the Yenisei River. The maximum values are marked in bold, the designations are as in Table 3

	Станции			P
	3 (n = 9)	3A (n = 10)	4 (n = 11)	
Al*	1,885\pm0,533	1,477 \pm 0,469	1,353 \pm 0,311	>0,05
Ca*	14,529 \pm 2,439	24,989\pm5,753	15,047 \pm 2,517	>0,05
Fe*	2,693\pm0,705	2,051 \pm 0,574	2,249 \pm 0,682	>0,05
K*	25,919\pm2,037	24,687 \pm 1,653	22,320 \pm 2,367	>0,05
Mg*	6,880 \pm 0,582	7,397\pm0,684	6,091 \pm 0,515	>0,05
Na*	7,368\pm0,947	7,028 \pm 0,709	7,001 \pm 0,726	>0,05
P*	2,092\pm0,331	1,525 \pm 0,116	1,596 \pm 0,123	>0,05
S*	2,900\pm0,171	2,601 \pm 0,149	2,514 \pm 0,224	>0,05
N*	32,07\pm2,39	27,80 \pm 0,85	27,17 \pm 1,28	>0,05
As	1,70\pm0,24	1,61 \pm 0,23	1,20 \pm 0,15	>0,05
B	10,82\pm0,88	9,57 \pm 0,60	10,36 \pm 0,59	>0,05
Ba	50,50 \pm 4,33	51,40 \pm 5,29	79,22\pm11,67	>0,05
Cd	^a1,32\pm0,22	^a 1,17 \pm 0,20	^b 0,46 \pm 0,07	<0,05
Co	3,09\pm0,33	2,65 \pm 0,49	2,04 \pm 0,35	>0,05
Cr	6,33\pm1,56	4,12 \pm 1,24	6,16 \pm 1,07	>0,05
Cu	^a 62,10 \pm 10,75	^a 72,62 \pm 9,65	^b 32,85 \pm 2,54	<0,05
Li	2,65 \pm 0,64	2,24 \pm 0,56	3,29\pm0,73	>0,05
Mn	1267,67 \pm 202,43	1276,82\pm234,29	969,39 \pm 126,78	>0,05
Mo	0,30 \pm 0,07	0,29 \pm 0,04	0,34\pm0,05	>0,05
Ni	^{ab} 26,05 \pm 4,46	^a 29,21 \pm 3,90	^b 16,67 \pm 2,46	<0,05
Pb	^a 3,64 \pm 0,58	^a 4,00 \pm 0,92	^b 1,38 \pm 0,27	<0,05
Sr	115,36 \pm 12,54	131,30\pm12,79	103,80 \pm 12,66	>0,05
V	4,33\pm1,22	3,53 \pm 1,04	3,56 \pm 0,98	>0,05
Zn	^a 255,78 \pm 57,83	^a 225,34 \pm 43,44	^b 109,68 \pm 30,67	<0,05

As, чем в исследованных видах макрофитов, кроме урути. Роголистник содержал достоверно больше K, по сравнению с урутью, Na – по сравнению с элодеей, рдестом стеблеобъемлющем и спирогирой. Содержание Mg в роголистнике было достоверно выше, чем в элодее, рдесте стеблеобъемлющем и урути. Рдест стеблеобъемлющий содержал больше Ca, чем роголистник и уруть, а также Sr, чем

роголистник. Содержание Cu в роголистнике и спирогире достоверно превышало таковое в других видах макрофитов, кроме элодеи. Роголистник и уруть содержали больше Mn, чем два вида рдестов. Рдест гребенчатый содержал достоверно меньше Zn, чем роголистник.

В рамках линейного дискриминантного анализа изученные виды растений были распределены в пространстве двух дискри-

Таблица 6. Содержание элементов (среднее \pm стандартная ошибка, мг/кг, $^* \text{г/кг}$ сухого веса) в пробах спирогиры (*Spirogyra* sp.) Абаканской протоки р. Енисей («н.о.» – ниже предела обнаружения). Жирным шрифтом отмечены максимальные значения, обозначения, как в табл. 3

Table 6. Element contents (Mean \pm SE, mg·kg⁻¹, $^* \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry weight) in the samples of *Spirogyra* sp. in the Abakanskaya anabanch of the Yenisei River («н.о.» – below detection limit). The maximum values are marked in bold, the designations are as in Table 3

	Станции				P
	2 (n = 3)	3 (n = 8)	3A (n = 9)	4 (n = 8)	
Al*	^a 1,011 \pm 0,232	^{ab} 6,513 \pm 1,878	^{ab} 4,681 \pm 0,611	^b 9,815\pm4,023	$<0,05$
Ca*	26,043 \pm 17,081	29,321 \pm 7,409	39,074 \pm 3,290	67,698\pm24,415	$>0,05$
Fe*	2,293 \pm 0,472	8,381 \pm 2,393	6,410 \pm 0,860	16,955\pm7,572	$>0,05$
K*	3,837 \pm 0,249	17,345 \pm 2,154	18,282\pm1,569	12,777 \pm 4,432	$>0,05$
Mg*	^a 2,042 \pm 0,150	^{ab} 3,896 \pm 0,814	^{ab} 3,463 \pm 0,298	^b 7,328\pm2,685	$<0,05$
Na*	^a 3,995\pm0,204	^b 0,781 \pm 0,220	^b 0,821 \pm 0,084	^a 3,335 \pm 0,721	$<0,05$
P*	^a 0,517 \pm 0,041	^b 1,689 \pm 0,135	^b 1,448 \pm 0,098	^{ab} 1,746\pm0,588	$<0,05$
S*	2,590 \pm 0,319	6,609 \pm 1,386	5,387 \pm 1,490	8,815\pm3,415	$>0,05$
N*	н.д.	33,35\pm3,20	32,69 \pm 1,84	22,96 \pm 4,65	$>0,05$
As	5,85\pm0,47	4,46 \pm 0,59	4,35 \pm 0,43	5,36 \pm 1,79	$>0,05$
B	н.о.	5,17 \pm 2,12	8,01 \pm 4,00	23,22\pm12,52	$>0,05$
Ba	^a 3561,47\pm260,32	^b 140,86 \pm 37,28	^b 93,32 \pm 4,09	^{ab} 763,73 \pm 248,57	$<0,05$
Cd	1,33\pm0,96	0,39 \pm 0,06	0,53 \pm 0,08	0,32 \pm 0,07	$>0,05$
Co	3,97 \pm 0,56	4,31 \pm 1,17	3,32 \pm 0,46	8,62\pm3,42	$>0,05$
Cr	^a 3,06 \pm 0,93	^b 20,03 \pm 5,66	^{ab} 14,00 \pm 1,69	^b 38,05\pm14,24	$<0,05$
Cu	^a 7,10 \pm 0,27	^b 65,12\pm15,24	^b 56,72 \pm 7,90	^{ab} 54,06 \pm 18,13	$<0,05$
Li	^a 2,52 \pm 0,11	^{ab} 8,30 \pm 2,26	^{ab} 6,68 \pm 0,63	^b 20,11\pm7,05	$<0,05$
Mn	3227,14\pm393,39	873,19 \pm 75,20	892,35 \pm 132,64	1343,65 \pm 479,99	$>0,05$
Mo	0,82 \pm 0,33	0,74 \pm 0,10	0,63 \pm 0,20	0,84\pm0,29	$>0,05$
Ni	6,80 \pm 0,64	15,01 \pm 3,62	13,91 \pm 1,71	30,77\pm11,79	$>0,05$
Pb	5,04 \pm 1,64	6,77 \pm 1,95	7,92 \pm 0,52	9,91\pm3,50	$>0,05$
Sr	80,27 \pm 30,24	164,35 \pm 28,91	176,36 \pm 11,05	264,11\pm88,13	$>0,05$
V	^a 4,09 \pm 1,16	^{ab} 14,65 \pm 4,03	^{ab} 12,10 \pm 1,28	^b 32,05\pm15,04	$<0,05$
Zn	59,45 \pm 6,40	107,75 \pm 19,75	104,44 \pm 13,80	124,14\pm46,53	$>0,05$

минантных функций (ДФ1 и ДФ2) (рис. 3a). Наибольший вклад в ДФ1, описывающую 47 % межгрупповой изменчивости, преимущественно вносили Li, Mg, V и Zn (рис. 3b). Распределение по ДФ2, описывающей 30 % изменчивости, связано с различиями в содержании As, Fe, Sr и V. Наиболее обособленную группу в пространстве ДФ1 и ДФ2 составила спирогира. Процент корректной классифика-

ции по данному виду составил 100 %. Спирогира содержала больше (более чем в два раза) некоторых элементов (напр. Fe, Li, V, Pb, Co, Ba, As, Al), чем прочие виды. Остальные виды макрофитов сформировали два кластера. Одну группу составили *E. canadensis* и *P. perfoliatus*; другую, с высокой степенью перекрывания – *Myriophyllum* sp., *S. pectinata* и *C. demersum*.

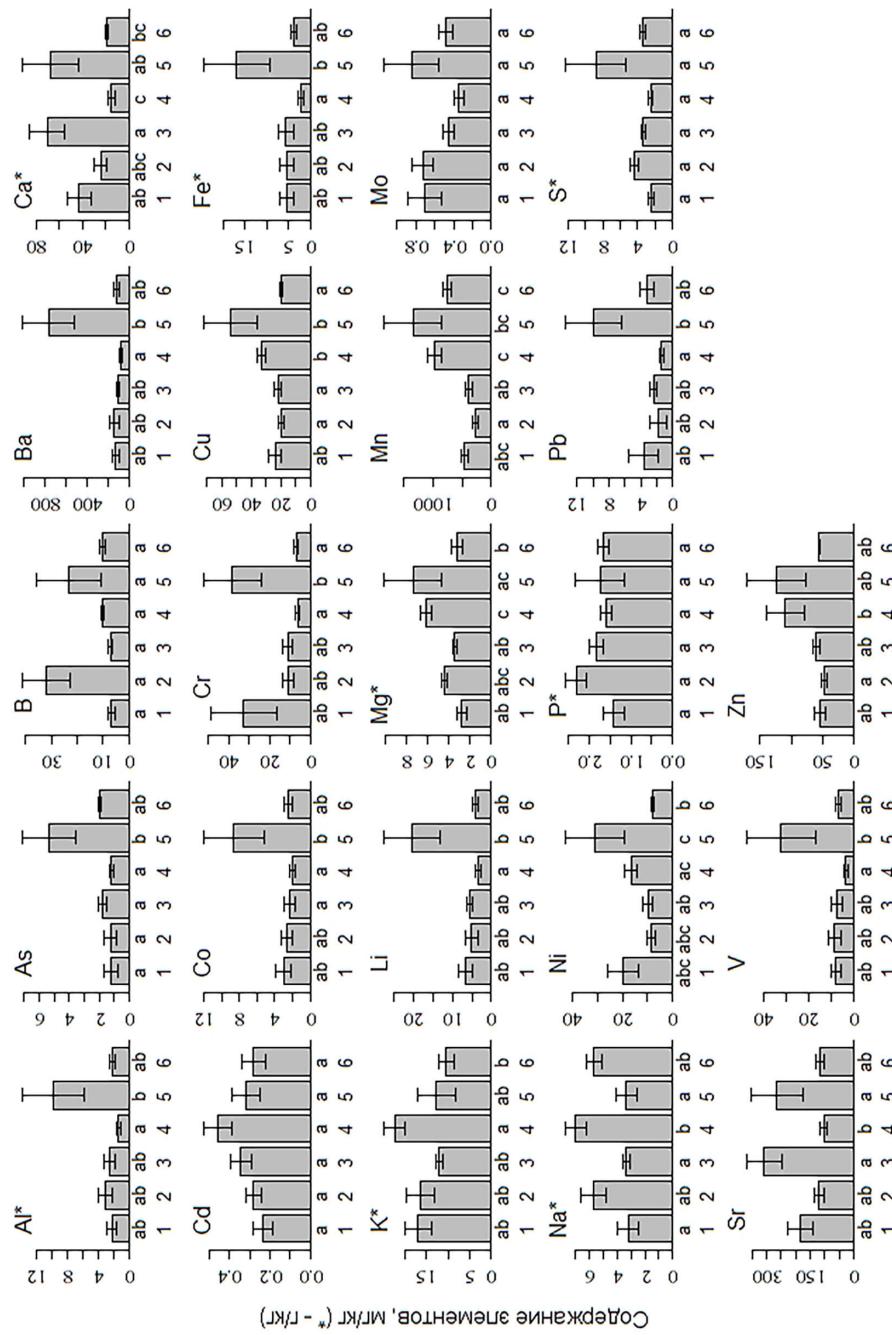


Рис. 2. Содержание элементов (среднее±стандартная ошибка, mg/kg , $^*-\text{г}/\text{kg}$) в макрофитах на ст. № 4 Абаканской протоки р. Енисей: 1 – *E. canadensis* ($n = 6$), 2 – *S. pectinata* ($n = 5$), 3 – *P. pectinata* ($n = 8$), 4 – *C. demersum* ($n = 8$), 5 – *Spirogyra* sp. ($n = 8$), 6 – *Myriophyllum* sp. ($n = 8$). Одинаковыми буквами отмечено отсутствие достоверных отличий по *post-hoc* тесту

Fig. 2. Element contents (Mean \pm SE, $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry weight) in macrophytes at site 4 in the Abakanskaya anabanch of the Yenisei River: 1 – *E. canadensis* ($n = 6$), 2 – *S. pectinata* ($n = 5$), 3 – *P. pectinata* ($n = 8$), 4 – *C. demersum* ($n = 8$), 5 – *Spirogyra* sp. ($n = 8$), 6 – *Myriophyllum* sp. ($n = 8$). The same letters indicate the absence of significant differences in the *post-hoc* test

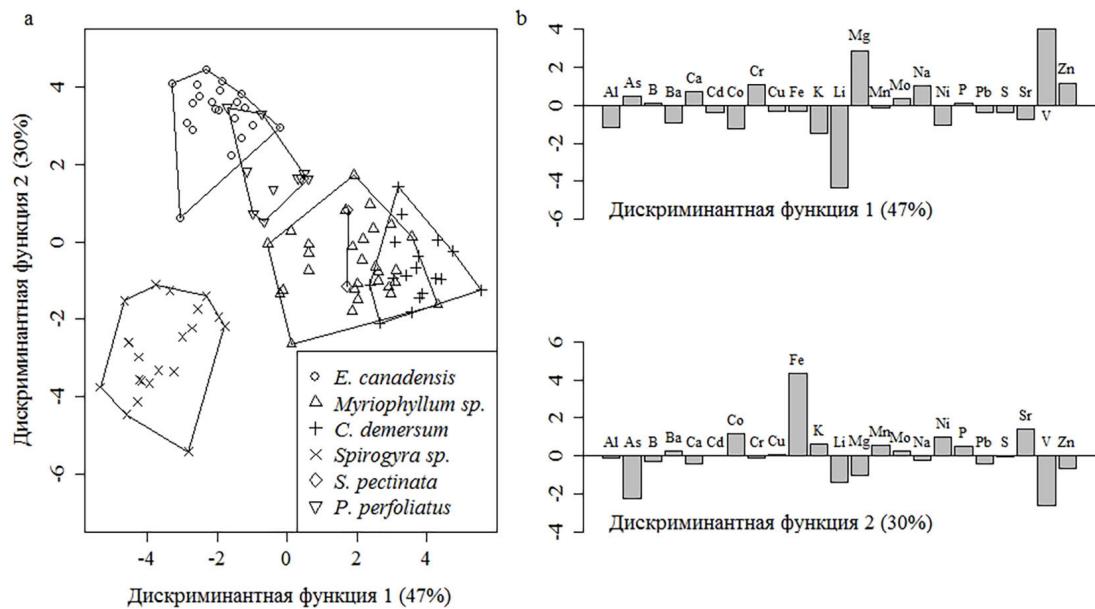


Рис. 3. Распределение проб шести видов макрофитов в пространстве линейных дискриминантных функций (а) и величины стандартизированных коэффициентов этих функций (б)

Fig. 3. The distribution of samples of six species of macrophytes in the space of linear discriminant functions (a) and the values of the standardized coefficients of these functions (b)

Обсуждение

В пробах воды со станции № 1 обнаружено превышение ПДК для рыбохозяйственных водоемов (Об утверждении..., 2016) общей концентрации Al, Cu и Mo, что отмечалось для Al и Cu ранее на фоновом участке р. Енисей, расположенным в 9 км выше г. Красноярска (в 30 км ниже плотины Красноярской ГЭС) (Anishchenko et al., 2009). На ст. № 3 наблюдается достоверное увеличение содержания Cu в воде, по сравнению с фоновым участком и ст. № 2, что может свидетельствовать об антропогенном источнике поступления данного металла, вероятно, с водами ТЭЦ, которые также способствуют повышению температуры на ст. № 3 и № 4, вызывая тепловое загрязнение. В работе (Коротченко, Мучкина, 2016) показано, что в почве вблизи ТЭЦ-2 содержание подвижных форм меди превышало ПДК в 9 раз. Достоверное увеличение, по сравнению с фоновым участком,

минерализации (УЭП), содержания Ва, В, Са, Na, Mg, Mn, Li, Sr в воде на станции № 2 могло быть связано с поступлением ливневых сточных вод, обнаруженных ранее (Кравчук и др., 2021). Элементный анализ ливневых сточных вод, поступающих в р. Енисей на ст. № 2, отобранных 23.07.2019 г., показал (собственные неопубликованные данные), что концентрации ряда элементов превышают обнаруженные в воде на станции № 2, в том числе В – в 2,7, Ва – в 1,2, Са – в 1,5, Mg – в 2, Li – в 6,3, Na – в 2, K – в 2,2, Sr – в 1,4 раза, а также УЭП – в 1,5 раза. Как показано в работе (Тюлюш, Коротченко, 2018), содержание подвижных форм Mn в почве г. Красноярска превышает ПДК в 1,2–1,8 раза. Поскольку содержание Mn в подземных водах г. Красноярска также превышает ПДК (<https://www.rosnedra.gov.ru/data/Fast/Files/202011>), можно предположить, что Mn поступал в Енисей с грунтовыми водами, мигрируя из почвы. По-

вышение концентрации NO_2^- в воде отмечено на станции № 3, где располагается рыболовное хозяйство, а максимальная концентрация NO_2^- отмечена на станции № 4. Как известно, аммиак является основным продуктом метаболизма азота у рыб (Wright, 1995), поступая в воду, подвергается нитрификации, в результате которой образуются нитриты, а затем нитраты (EPA, 2002). Проведенный анализ 9 видов коммерческих кормов для аквакультуры рыб, показал, что содержание К составляет 0,6–1,1 %, Р – 0,5–1,7 % сухого веса (собственные неопубликованные данные). На станции № 4 наблюдалось повышение концентрации К и общего фосфора (Р общ.) в воде, при этом достоверное отличие от фона отмечено только для К. Вероятно, увеличение концентрации К могло быть связано с влиянием рыболовного хозяйства.

Перифитонные водоросли, наряду с высшими сосудистыми растениями, являются мониторами загрязнения водных экосистем (Behra et al., 2002; Rai, 2009). Зеленые нитчатые водоросли р. *Spirogyra* могут использоваться для фиторемедиации, поскольку способны накапливать большое количество токсичных элементов в биомассе (Rajfur et al., 2011; Hamidian et al., 2016; Vetrivel et al., 2017). В пробах спирогиры р. Енисей содержание большинства элементов превышало таковое в других видах макрофитов – представителей высшей водной растительности (рис. 2). В спирогире Абаканской протоки на ст. № 4 наблюдалось повышенное содержание Al, Mg, Cr, Li, V, на станциях № 3 и № 3А – Cu по отношению к станции № 2 (табл. 6). В спирогире р. Енисей содержание Mn, Cd и Pb не превышало таковое в пробах *Spirogyra* sp. из оз. Турава (Turawa lake, Польша), подверженного загрязнению данными металлами. Однако содержание Cu в пробах спирогиры (54,06–65,12 мг/кг) со ст. № 3–4 Абаканской

протоки, испытывающих антропогенное воздействие, превышало максимальное значение (47,5 мг/кг) для данного вида водоросли в районе загрязнения оз. Турава (Rajfur et al., 2011). В пробах спирогиры из р. Енисей обнаружено больше Fe, чем на загрязненных участках оз. Турава (максимум 15,06 мг/кг).

Способность высших водных растений быстро поглощать ТМ из окружающей среды, даже при очень низких уровнях, позволяет использовать их в качестве эффективных индикаторов качества водных экосистем (Matache et al., 2013; Остроумов и др., 2016). Динамика развития макрофитов в водоемах Беларуси позволила сделать вывод о том, что элодея канадская, роголистник погруженный и рдест гребенчатый служат индикаторами загрязнения органическими веществами и тяжелыми металлами (Гигевич и др., 2001, цит. по Волкова и др., 2018). В Абаканской протоке ниже дамбы обнаружено достоверно повышенное, по сравнению с фоновым участком, содержание Cu, Zn (на ст. № 3 и № 3А) и Sr (на ст. № 3А) в пробах элодеи (табл. 3), Cu (на ст. № 3 и № 3А) и Sr (на ст. № 2 и № 3) в пробах урути (табл. 4). Роголистник на ст. № 3 и № 3А характеризовался повышенным содержанием Cu и Zn, по сравнению со ст. № 4 (табл. 5). Как показано в работе (Samecka-Czymerman, Kempers, 2003), в условиях загрязнения реки Row Slaski (Польша) коммунальными отходами элодея содержала до 217 мг/кг Cu. Содержание Cu в макрофитах Абаканской протоки не превышало величин, полученных для высших водных растений незагрязненных водоемов (0,14–55 мг/кг) (Outridge, Noller, 1991), за исключением роголистника (62,1–72,62 мг/кг) на ст. № 3 и № 3А (табл. 5). Указанные значения по Cu в роголистнике превысили максимальные величины для данного вида из загрязненных водных объектов (12–51 мг/кг) (Outridge, Noller, 1991). Элодея нака-

пливалась Sr, содержание которого на порядок превышало таковое из рек незагрязненных и находящихся под влиянием сточных коммунальных вод (Samecka-Cymerman, Kempers, 2003), при этом общее содержание Sr в воде р. Енисей не превышало значений в реках Польши (около 0,3 мг/л). Очевидно, накопление Cu и Sr макрофитами определялось их повышенным содержанием в воде (табл. 2). Высокий уровень накопления Sr рдестом гребенчатым был отмечен в пресноводном водохранилище Бугач и соленых озерах Шира и Шунет (среднее содержание в листьях – около 570 мг/кг), где наблюдался естественный повышенный фон (от 1 до 13,5 мг/л Sr в воде) (Anishchenko et al., 2020). Согласно литературным данным содержание Zn в высшей водной растительности (ВВР) незагрязненных водных объектов варьирует от 11 до 250 мг/кг. Известно, что в элодее, произрастающей на незагрязненных участках, содержание Zn составляет 24–38 мг/кг, тогда как в условиях загрязнения наблюдается рост содержания данного элемента от 15–47 мг/кг (Outridge, Noller, 1991) до 73–770 мг/кг (Samecka-Cymerman, Kempers, 2003). Роголистник в условиях отсутствия загрязнения содержал 160 мг/кг Zn (Samecka-Cymerman, Kempers, 2003). В р. Енисей на ст. № 3 и № 3А, подверженных антропогенному влиянию, содержание Zn в элодее и роголистнике свидетельствует о загрязнении экосистемы данным элементом.

На фоновом участке содержание Pb в урути было ниже предела обнаружения, тогда как на ст. № 3 и № 3А содержание данного элемента возрастило в среднем до 3,46–3,97 мг/кг и соответствовало значениям, полученным для роголистника (3,64–4,0 мг/кг) на данных участках. Для элодеи увеличение содержания Pb на ст. № 3–4 было недостоверным. Содержание Pb в исследованных нами макрофитах входит в диапазон значений для водных со-

судистых растений незагрязненных водных объектов (0,3–35 мг/кг). В пробах макрофитов Абаканской протоки содержание Pb не превышает медиану для загрязненных экосистем (27 мг/кг) (Outridge, Noller, 1991). В загрязненных водных экосистемах содержание Pb в элодее варьирует в пределах 29–230 мг/кг. На ст. № 3 и № 3А Абаканской протоки роголистник накапливал Ni, содержание которого превышало пределы варьирования для ВВР незагрязненных экосистем (0,85–23 мг/кг). В урути содержание Ni не превышало указанный диапазон концентраций для незагрязненных экосистем. Ni относится к ТМ, но является эссенциальным элементом, поскольку подтверждена его роль в метаболизме уреазы высших растений и гидрогеназы цианобактерий (Muysen et al., 2004). Содержание Li в макрофитах на ст. № 4 превышало фоновое значение, но достоверные отличия отмечены только для урути (табл. 4). Несмотря на то, что концентрация Pb, Zn и Ni в воде на станциях № 3 и № 4 не отличалась достоверно от других участков, их содержание в макрофитах было повышенным, что может быть связано с их поступлением из донных отложений.

Тяжелые металлы Cu и Zn являются жизненно необходимыми (эссенциальными) элементами для растений, поскольку входят в состав ферментов, обеспечивают клеточный метаболизм и множество физиологически важных процессов. Содержание Cu и Zn в растениях напрямую зависит от содержания в среде их обитания, поступают данные металлы в растения как активной, так и пассивной абсорбцией (Kabata-Pendias, Pendias, 2001). Pb, Sr и Li относятся к неэссенциальным элементам, биологическая роль которых не известна или не исследована до конца (Kabata-Pendias, Pendias, 2001; Barker, Pilbeam, 2015). Li может замещать K, Na, Ca, Mg в нормальных метаболических процессах рас-

тений и, как и Sr (Burger, Lichtscheidl, 2019), конкурировать с Ca (Shahzad et al., 2016).

Повышенное содержание Ca в воде на участках за дамбой, вероятно, способствовало более эффективному накоплению данного эссенциального элемента элодеи (на ст. № 3А) и урутью (на ст. № 2) (табл. 3, 4), по сравнению с фоновыми значениями. Ca выполняет структурную и сигнальную функцию в клетке (White, Broadley, 2003), накапливается чаще в листьях в виде оксалатов (Franceschi, Nakata, 2005), может откладываться в виде кальцита (карбоната кальция) вне, внутри и между клеток водных растений (Borowitzka, 1984). Уруть на станции № 3А содержала больше Na, чем на фоновом участке (отличия не были достоверными), что могло быть связано с повышенной концентрацией данного элемента в воде на участках ниже дамбы (табл. 2). Na рассматривается как «функциональный» элемент для растений, поскольку способен заменять K в регуляции клеточного осмоса, выступать в качестве сопутствующего транспортного катиона (Subbarao et al., 2003; Maathuis, 2014). Содержание Ba в элодее было достоверно выше на станциях № 2 (как и в воде), № 3А, № 4, по сравнению с фоновым участком. Ba не относится к эссенциальным элементам растений, может выступать антагонистом Ca, Mg и S (Kabata-Pendias, Pendias, 2001). Содержание As, Co, Cr, Pb, Mn, Mo, V в исследованных видах ВВР Абаканской протоки входит в пределы варьирования значений, полученных для незагрязненных водных экосистем (Outridge, Noller, 1991).

Роголистник содержал минимум Al, As, Ba, Ca, Co, Fe, Li, Mo, Pb, V и Sr среди макрофитов Абаканской протоки (рис. 2). Поскольку роголистник не укореняется в грунт, он получает элементы только из воды (Shinkareva et al., 2019), в отличие от других исследованных высших водных растений, которые могут

получать элементы из донных отложений. Роголистник погруженный содержал больше Cd, по сравнению с другими макрофитами на ст. № 4, хотя отличия не были достоверными. Известно, что роголистник является гипераккумулятором кадмия (Matache et al., 2013). На ст. № 4 роголистник погруженный содержал больше Cu, Mn и Zn, чем рдесты, что согласуется с отмеченными различиями для данных видов (Matache et al., 2013).

В результате проведенного дискриминантного анализа данных по содержанию элементов в исследованных макрофитах на станции № 4 было выявлено три кластера (рис. 3а). Вероятно, в основе разделения погруженных макрофитов на кластеры лежат не только таксономические/видоспецифические, но и морфологические и физиологические отличия. Образующие общую группу *Myriophyllum* sp., *C. demersum* и *S. pectinata* имеют рассеченные листья, в отличие от макрофитов из другого кластера – *E. canadensis* и *P. perfoliatus*, с цельными листьями. Было показано (Shinkareva et al., 2019), что *Myriophyllum spicatum*, *C. demersum* и *S. pectinata* входили в группу погруженных макрофитов, обладающих высокой способностью аккумулировать как растворенные (U, As, B, Cd), так и содержащиеся в составе взвеси (Fe, Al, Pb, Ni, Co, Be, Cr, V) элементы в воде дельты р. Селенга. *C. demersum* и в большей степени *Myriophyllum spicatum*, благодаря сильно рассеченным перистым листьям, играли важную роль в качестве биофильтра взвешенных частиц (Shinkareva et al., 2019). Можно предположить, что виды с большей площадью поверхности аккумулируют больше ТМ. Однако проведенная ранее (Sher-Kaul et al., 1995) оценка площади поверхности, отнесенной к биомассе погруженных макрофитов, имеющих разную степень рассеченности листьев, показала, что

Elodea canadensis и *Myriophyllum spicatum* имели близкие значения площади поверхности (1255 см^2 и 1205 см^2 соответственно). При этом площадь поверхности рдеста гребенчатого и рдеста стеблеобъемлющего была в 2,5 и 1,6 раза меньше, чем у элодеи канадской (в расчете на 1 г сухой биомассы целого растения). В работе (Borisova et al., 2017) отмечен близкий уровень накопления ТМ (Cu, Ni, Zn, Mn, Fe) в листьях *E. canadensis* и *P. perfoliatus*. Данные виды макрофитов имели схожие морфологические и физиологические изменения под влиянием загрязнения ТМ: наблюдалось увеличение толщины листьев, размеров клеток, синтеза хлорофилла. Как отмечено в работе (Shinkareva et al., 2019) погруженные растения с рассечёнными листьями, образующие плотные заросли на глубине, в большей степени нуждаются в элементах (Fe, Mn, Zn), необходимых для фотосинтеза и дыхания, чем другие виды макрофитов.

Нитчатая зеленая водоросль *Spirogyra* sp. формирует отдельный от ВВР кластер (рис. 3а). Известно, что клетки водорослей состоят в основном из полисахаридов, которые не препятствуют проникновению металлов в клетку (Polishchuk, 1973. цит. по Pasichnaya, Arsan, 2003). Клеточная стенка микроводорослей содержит многофункциональные макромолекулы (липиды, белки и углеводы), которые имеют на своей поверхности различные отрицательно заряженные функциональные группы, позволяющие связывать ионы из окружающей среды. Таким образом, внешний слой клеточной стенки в первую очередь участвует в удалении ТМ. Зеленые микроводоросли способны поглощать токсичные металлы как с помощью внеклеточной биосорбции, так и механизмов внутриклеточной биоаккумуляции (Danouche et al., 2021). Аккумуляции металлов внутри клетки зеленых нитчатых водорослей способствует большой размер

вакуолей и, как следствие, увеличение асимилирующей поверхности клеток (Velichko, 1982, цит. по Pasichnaya, Arsan, 2003). В работе (Hamidian et al., 2016) показано, что *Spirogyra* накапливала больше Mg, V, Fe, As, Cd, Cr, Zn, чем Al, Cu, Mn, Ni, Pb из донных отложений (ДО). Повышенное содержание большинства элементов в *Spirogyra* sp. из Абаканской протоки, по сравнению с другими макрофитами, также могло быть связано с их поступлением из ДО, поскольку нитчатые водоросли произрастили на камнях на дне водотока, а затем из перифитонной формы, в ходе роста биомассы, отрываясь, переходили в метафитон (Кравчук и др., 2021). Предположительно водоросли могут поглощать металлы из частиц ДО, поскольку показано, что содержание ТМ в бентических водорослях коррелирует с таковым в ДО (Luoma et al., 1982).

Как показал дискриминантный анализ (рис. 3а, б), наибольший вклад в межгрупповые различия макрофитов вносили как эссенциальные элементы, Mg, Zn, Fe, V, так и неэссенциальные, биологическая роль которых не установлена, As, Li, Sr. Как известно, Mg входит в состав молекулы хлорофилла и играет важную роль в ферментативных процессах, связанных с фотосинтезом и дыханием, асимиляцией углерода и превращением энергии (Barker, Pilbeam, 2015). Fe содержится в основном в хлоропластах, участвует в синтезе хлорофилла, переносе электронов в фотосинтезе и других процессах (восстановление нитритов и сульфатов). Zn связан с метаболизмом углеводов, белков, фосфатов, образованием РНК и рибосом (Kabata-Pendias, Pendias, 2001). V стимулирует фотосинтез некоторых водорослей (Kabata-Pendias, Pendias, 2001), может замещать железо, в случае его недоступности, для высших растений (Barker, Pilbeam, 2015). Известно, что неэссенциальные элементы могут проникать в клетки

высших водных растений, используя каналы поступления жизненно необходимых элементов, например As (в виде арсенатов) – через фосфатный путь (Xue et al., 2012), Li может транспортироваться в клетку через те же каналы, что и ионы K (Shahzad et al., 2016), Sr – с помощью транспортеров Ca и K (Burger, Lichtscheidl, 2019). Таким образом, разделение макрофитов на группы может определяться физиологическими потребностями в незаменимых элементах для осуществления фотосинтеза и других жизненно важных функций и особенностями накопления ряда неэссенциальных элементов.

Заключение

В воде Абаканской протоки р. Енисей обнаружено превышение ПДК для рыбохозяйственных водоемов по общему содержанию Al (в 1,25–1,5 раза) на фоновом участке и ст. № 3, Mn (в 1,7 раза) на ст. № 2, Cu (в 2–4 раза) и Mo (в 1,1–1,9 раза) на всех исследованных участках. Ниже дамбы отмечено достоверное увеличение, по сравнению с фоном, минерализации (УЭП), концентрации B, Ba, Ca, Mg, Li, Na, Sr, Mn в воде, что могло быть

связано с поступлением ливневых сточных и грунтовых вод; концентрации Cu, вероятно, поступающей с подогретыми водами ТЭЦ; концентрации K и NO_2^- в воде, на участке, подверженном воздействию рыбоводного хозяйства. На участках антропогенного воздействия выявлено увеличение содержания Ba, Ca, Cu, Sr и Zn в элодее, Ca, Cu, Pb, Sr и Li в урути (по сравнению с условно фоновым участком). Сравнение с опубликованными данными показало, что содержание Cu и Fe в зеленой нитчатой водоросли *Spirogyra* sp., Cu, Ni и Zn в роголистнике (*C. demersum*), Sr и Zn в элодее (*E. canadensis*) в Абаканской протоке свидетельствует о загрязнении данными ТМ. Среди исследованных шести видов погруженных макрофитов выявлены три кластера, различающиеся по содержанию элементов: элодея и рдест стеблеобъемлющий; уруть, рдест гребенчатый, роголистник погруженный; спирогира. Полученные различия могут определяться морфологией, физиологическими потребностями в незаменимых элементах (Mg, Zn, Fe и V) и особенностями накопления ряда неэссенциальных (As, Li, Sr) элементов растениями.

Список литературы / References

Волкова И. В., Ершова Т. С., Шипулин С. В. (2018) *Оценка качества воды водоемов рыбопромышленного назначения*. Москва, Юрайт, 294 с. [Volkova I. V., Ershova T. S., Shipulin S. V. (2018) *Assessment of the water quality of reservoirs for fishery purposes*. Moscow, Uright, 294 p. (in Russian)]

ГОСТ 33045–2014. *Межгосударственный стандарт. Вода. Методы определения азотсодержащих веществ* (2015) Москва, Стандартинформ, 20 с. [GOST 33045–2014. *Interstate standard. Water. Nitrogen-containing substances measurement methods* (2015) Moscow, Standartinform, 20 p. (in Russian)]

Катанская В. М. (1981) *Высшая водная растительность континентальных водоемов СССР. Методы изучения*. Л., Наука, 187 с. [Katanskaya V. M. (1981) *Higher aquatic vegetation of continental water bodies of the USSR. Research methods*. Leningrad, Nauka, 187 p. (in Russian)]

Коротченко И. С., Мучкина Е. Я. (2016) Тяжелые металлы в техногенных поверхностных образованиях Красноярской агломерации. *Современные проблемы науки и образования*, 4 [Korotchenko I. S., Muchkina E. Y. (2016) Heavy metals in technogenic surface formations of

Krasnoyarsk agglomeration. *Modern Problems of Science and Education* [Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya], 4 (in Russian)]

Кравчук Е. С., Дубовская О. П., Шулепина С. П., Анищенко О. В., Иванова Е. А., Глущенко Л. А., Сущик Н. Н., Махутова О. Н., Колмакова А. А., Толомеев А. П., Дроботов А. В., Агеев А. В., Морозова И. И., Анищенко Ю. Д., Гладышев М. И. (2021) Влияние антропогенных факторов на экосистему протоки р. Енисей в черте города Красноярска. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология* [Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologiya], 14(2): 208–237 [Kravchuk E. S., Dubovskaya O. P., Shulepina S. P., Anishchenko O. V., Ivanova E. A., Glushchenko L. A., Sushchik N. N., Makhutova O. N., Kolmakova A. A., Tolomeev A. P., Drobotov A. V., Ageev A. V., Morozova I. I., Anishchenko Yu. D., Gladyshev M. I. (2021) Effect of anthropogenic factors on the ecosystem of the Yenisei River anabanch within the city of Krasnoyarsk. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 14(2): 208–237 (in Russian)]

Никаноров А. М. (1989) *Гидрохимия*. Ленинград, Гидрометеоиздат, 352 с. [Nikanorov A. M. (1989) *Hydrochemistry*. Leningrad, Gidrometeoizdat, 352 p. (in Russian)]

Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 10 марта 2020 года). Министерство сельского хозяйства Российской Федерации приказ от 13 декабря 2016 года N 552. URL: <http://docs.cntd.ru/document/420389120> [The Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 2016. On the approval of water quality standards for water bodies of fishery significance, including standards for maximum permissible concentrations of harmful substances in the waters of water bodies of fishery significance (Amended on March 10, 2020). Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Order N 552 of December 13, 2016. URL: <http://docs.cntd.ru/document/420389120> (in Russian)]

Остроумов С. А., Данилова В. Н., Хушвахтова С. Д., Ермаков В. В., Тютиков С. Ф., Тропин И. В., Котелевцев С. В. (2016) Содержание химических элементов, глутатиона и металлотионеинов в элодее канадской (*Elodea canadensis*) в связи с экологическим мониторингом. *Экологическая химия*, 25(4): 197–203 [Ostroumov S. A., Danilova V. N., Khushvakhtova S. D., Ermakov V. V., Tyutikov S. F., Tropin I. V., Kotelevtsev S. V. (2016) Measurements of chemical elements, as well as glutathione and metallothioneins, in Elodea (*Elodea canadensis*): environmental monitoring considerations. *Ecological Chemistry* [Ekologicheskaya khimiya], 25(4): 197–203 (in Russian)]

РД 52.24.382–2006. Массовая концентрация фосфатов и полифосфатов в водах. Методика выполнения измерений фотометрическим методом (2006) Ростов-на-Дону, ГУ «Гидрохимический институт», 27 с. [*RD 52.24.382–2006. Mass concentration of phosphates and polyphosphates in water. Procedure of measurement by photometric method* (2006) Rostov-on-Don, Institute of Hydrochemistry, 27 p. (in Russian)]

РД 52.24.387–2006. Массовая концентрация фосфора общего в водах. Методика выполнения измерений фотометрическим методом после окисления персульфатом калия (2006) Ростов-на-Дону, ГУ «Гидрохимический институт», 26 с. [*RD 52.24.387–2006. Mass concentration of total phosphorus in water. Procedure for measurement by photometric method after oxidation by potassium persulfate* (2006) Rostov-on-Don, Institute of Hydrochemistry, 26 p. (in Russian)]

РД 52.24.380–2017. Массовая концентрация нитратного азота в водах. Методика измерений фотометрическим методом с реагентом Грисса после восстановления в кадмииевом ре-

дукторе (2017) Ростов-на-Дону, 30 с. [RD 52.24.380–2017. *Mass concentration of nitrate nitrogen in water. Measurement technique by photometric method with Griess reagent after reduction in cadmium reducer* (2017) Rostov-on-Don, 30 p. (in Russian)]

Тюлюш Т.С., Коротченко И.С. (2018) Экологическое состояние почв различных районов Красноярска. *Вестник КрасГАУ*, 6: 283–288 [Tyulyush T.S., Korotchenko I.S. (2018) Ecological state of soils of various areas of Krasnoyarsk. *The Bulletin of KrasGAU* [Vestnik KrasGAU], 6: 283–288 (in Russian)]

Anishchenko O. V., Gladyshev M. I., Kravchuk E. S., Sushchik N. N., Gribovskaya I. V. (2009) Distribution and migration of metals in trophic chains of the Yenisei ecosystem near Krasnoyarsk City. *Water Resources*, 36(5): 594–603

Anishchenko O. V., Tolomeev A. P., Ivanova E. A., Drobotov A. V., Kolmakova A. A., Zuev I. V., Gribovskaya I. V. (2020) Accumulation of elements by submerged (*Stuckenia pectinata* (L.) Börner) and emergent (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) macrophytes under different salinity levels. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154: 328–340

Barker A. V., Pilbeam D. J. (2015) *Handbook of plant nutrition. 2nd Edition*. CRC Press, 773 p.

Behra R., Landwehrjohann R., Vogel K., Wagner B., Sigg L. (2002) Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquatic Sciences*, 64(3): 300–306

Borisova G. G., Chukina N. V., Maleva M. G., Levchenko U. A. (2017) Accumulation of heavy metals in leaves of submerged hydrophytes (*Elodea canadensis* Michx. and *Potamogeton perfoliatus* L.) and their responses to the effect of the wastewater of a metallurgical plant. *Inland Water Biology*, 10(2): 176–181

Borowitzka M. A. (1984) Calcification in aquatic plants. *Plant, Cell and Environment*, 7(6): 457–466

Burger A., Lichtenheld I. (2019) Strontium in the environment: review about reactions of plants towards stable and radioactive strontium isotopes. *Science of the Total Environment*, 653: 1458–1512

Danouche M., El Ghachoui N., El Arroussi H. (2021) Phytoremediation mechanisms of heavy metals using living green microalgae: physicochemical and molecular approaches for enhancing selectivity and removal capacity. *Heliyon*, 7(7): e07609

EPA. *United States Environmental Protection Agency* (2002) *Nitrification*. 17 p.

Franceschi V. R., Nakata P. A. (2005) Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 41–71

Gladyshev M. I., Sushchik N. N., Kolmakova A. A., Kalachova G. S., Kravchuk E. S., Ivanova E. A., Makhutova O. N. (2007) Seasonal correlations of elemental and ω-3 PUFA composition of seston and dominant phytoplankton species in a eutrophic Siberian Reservoir. *Aquatic Ecology*, 41(1): 9–23

Gladyshev M. I., Sushchik N. N., Anishchenko O. V., Makhutova O. N., Kalachova G. S., Gribovskaya I. V. (2009) Benefit-risk ratio of food fish intake as the source of essential fatty acids vs. heavy metals: A case study of Siberian grayling from the Yenisei River. *Food Chemistry*, 115(2): 545–550

Hamidian A. H., Zareh M., Poorbagher H., Vaziri L., Ashrafi S. (2016) Heavy metal bioaccumulation in sediment, common reed, algae, and blood worm from the Shoor river, Iran. *Toxicology and Industrial Health*, 32(3): 398–409

- Hassan S., Schmieder K., Bocker R. (2010) Spatial patterns of submerged macrophytes and heavy metals in the hypertrophic, contaminated, shallow reservoir Lake Qattineh, Syria. *Limnologica*, 40(1): 54–60
- Kabata-Pendias A., Pendias H. (2001) *Trace elements in soils and plants, Third edition*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
- Luoma S. N., Bryan G. W., Langston W. J. (1982) Scavenging of heavy metals from particulates by brown seaweed. *Marine Pollution Bulletin*, 13(11): 394–396
- Matache M. L., Marin C., Rozylowicz L., Tudorache A. (2013) Plants accumulating heavy metals in the Danube River wetlands. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 11(1): 39
- Maathuis F. J. M. (2014) Sodium in plants: perception, signaling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany*, 65(3): 849–858
- Muyssen B. T. A., Brix K. V., DeForest D. K., Janssen C. R. (2004) Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. *Environmental Reviews*, 12(2): 113–131
- Outridge P. M., Noller B. N. (1991) Accumulation of toxic trace elements by freshwater vascular plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 121: 1–63
- Pasichnaya Ye. A., Arsan O. M. (2003) Accumulation of copper and manganese by some submerged higher aquatic plants and filamentous algae. *Hydrobiological Journal*, 39(5): 59–66
- Rai P. K. (2009) Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(9): 697–753
- Rajfur M., Kłos A., Wacławek M. (2011) Algae utilization in assessment of the large Turawa Lake (Poland) pollution with heavy metals. *Journal of Environmental Science and Health-Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 46(12): 1401–1408
- Samecka-Cymerman A., Kempers A. J. (2003) Biomonitoring of water pollution with *Elodea canadensis*. A case study of three small polish rivers with different levels of pollution. *Water, Air, and Soil Pollution*, 145(1–4): 139–153
- Shahzad B., Tanveer M., Hassan W., Shah A. N., Anjum S. A., Cheema S. A., Ali I. (2016) Lithium toxicity in plants: reasons, mechanisms and remediation possibilities – a review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107: 104–115
- Sher-Kaul S., Oertli B., Castella E., Lachavanne J.-B. (1995) Relationship between biomass and surface area of six submerged aquatic plant species. *Aquatic Botany*, 51(1–2): 147–154
- Shinkareva G. L., Lychagin M. Yu., Tarasov M. K., Pietroń J., Chichaeva M. A., Chalov S. R. (2019) Biogeochemical specialization of macrophytes and their role as a biofilter in the Selenga delta. *Geography, Environment, Sustainability*, 12(3): 240–263
- Subbarao G. V., Ito O., Berry W. L., Wheeler R. M. (2003) Sodium-a functional plant nutrient. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(5): 391–416
- Vetrivel S. A., Diptanghu M., Ebhin M. R., Sydavalli S., Gaurav N., Tiger K. P. (2017) Green algae of the genus *Spirogyra*: A potential absorbent for heavy metal from coal mine water. *Remediation*, 27(3): 81–90
- Xue P., Yan C., Sun G., Luo Z. (2012) Arsenic accumulation and speciation in the submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(9): 3969–3976
- White P. J., Broadley M. R. (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92(4): 487–511
- Wright P. A. (1995) Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*, 198(2): 273–281

EDN: ZZYKWQ

УДК 615, 614.35, 547.9, 57.044, 57.083.1, 543.95, 543.55, 543.424

The Procedure of Electrochemical Microbiological Assay for Comparative Analysis of the Properties of Various Plant Extracts

**Vladimir S. Sibirtsev^{a*},
Uliana Yu. Nechiporenko^a, Vladimir L. Kabanov^b,
Mikhail Yu. Kukin^c and Mikhail A. Radin^a**

^a*Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University
Saint Petersburg, Russian Federation*

^b*All-Russia Research Institute for Food Additives
Saint Petersburg, Russian Federation*

^c*Scientific Research Institute of the Bakery Industry
Saint Petersburg, Pushkin, Russian Federation*

Received 19.09.2020, received in revised form 23.10.2022, accepted 11.11.2022

Abstract. Recently, the content of biologically active substances (BAS) of natural origin in food, pharmaceutical, cosmetic, and other products manufactured and consumed by humans has been steadily decreasing. Among the most acceptable and common sources of such BAS are various plant extracts. Moreover, the problem of developing sufficiently objective and at the same time rapid and widely applicable methods for quantitative assessment of pro- and antibiotic properties of a large number of products, both new and already approved for use, is becoming increasingly urgent. Thus, the purpose of this study was 1) to develop a rapid and objective instrumental method for assessing pro- and antibiotic properties of various samples of food, pharmaceutical, cosmetic, and other products and 2) to analyze the influence of various plant extracts on the biochemical activity of typical representatives of human microbiota and pathogenic microflora by using this method. The bioassay procedure has been developed, which includes periodic (every 2 h) recording of changes in pH, redox potential, and electrical conductivity of a liquid nutrient test medium (NTM) inoculated with viable test microorganisms (TM) and incubated in the presence and absence of test samples (TS). This procedure was used to conduct comparative analysis of the pro- and antibiotic activity of different concentrations of subcritical whole extracts prepared from 10 different types of plant raw materials using liquefied CO₂ against *Escherichia coli*, *Lactobacillus*

© Siberian Federal University. All rights reserved

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

* Corresponding author E-mail address: vs1969r@mail.ru

ORCID: 0000-0003-0829-5213 (Sibirtsev V.); 0000-0002-4102-1129 (Nechiporenko U.); 0000-0001-9085-2984 (Kabanov V.); 0000-0003-1722-4644 (Kukin M.); 0000-0001-9951-7955 (Radin M.)

acidophilus, and *Staphylococcus aureus*. The study shows that among the TS, the most active long-term antibiotic properties are exhibited by extracts of wormwood (*Artemisia taurica*) and wild rosemary (*Ledum palustre*) leaves and marsh calamus (*Acorus calamus*) roots at NTM concentrations of 3 vol.% or higher. The most active long-term probiotic properties were exhibited by extracts of common juniper (*Juniperus communis*) berries, elecampane (*Inula helenium*) roots, calamus (*Acorus calamus*) roots, and yarrow (*Achillea millefolium*) leaves at NTM concentrations of 0.2 vol.%. The initial biological activity of most TS was greater than their long-term activity. At the same time, the mid-term (relative to the TS/TM interaction time) antibiotic activity of most TS was intermediate between their initial and long-term activity. Thus, it is obvious that the biological activity of food and other products containing various plant extracts is determined not only by the BAS composition of the product but also by the concentration of the extract in the product, the time of its interaction with living organisms (humans, their microbiota, etc.), and other factors. Moreover, the exact nature of these relationships in most cases can be established only empirically, by performing a considerable number of tests. These tests can be conveniently carried out using the procedure described in this work, which is less labor- and material-intensive than conventional microbiological methods. This procedure gives much more rapid, objective, and informative assessments of the effects of various samples of food, pharmaceutical, cosmetic, and other products and individual ingredients and additives on the dynamics of the vital activity of microorganisms (which, as shown in the work, reliably correlates with their biochemical activity).

Keywords: microbiological assay, antibiotic properties, plant extracts.

Citation: Sibirtsev V.S., Nechiporenko U. Yu., Kabanov V.L., Kukin M. Yu., Radin M. A. The procedure of electrochemical microbiological assay for comparative analysis of the properties of various plant extracts. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2023, 16(1), 109–124. EDN: ZZYKWQ.



Методика электрохимического микробиологического тестирования в применении к сравнительному анализу свойств различных растительных экстрактов

**В. С. Сибирцев^а, У. Ю. Нечипоренко^а,
В. Л. Кабанов^б, М. Ю. Кукин^в, М. А. Радин^а**

*^аСанкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет
Российская Федерация, Санкт-Петербург*

*^бВсероссийский научно-исследовательский институт
пищевых добавок
Российская Федерация, Санкт-Петербург*

*^вНИИ хлебопекарной промышленности
Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пушкин*

Аннотация. В последнее время в пищевой, фармацевтической, косметической и иной продукции, производимой и потребляемой человеческим обществом, ощущается всё больший недостаток биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения, одним из наиболее приемлемых и распространённых источников которых являются различные растительные экстракты (РЭ). Кроме того, всё более актуальной становится проблема разработки достаточно объективных и в то же время экспрессных и доступных для широкого применения методов количественной оценки про- и антибиотических свойств большого количества образцов как новой, так и уже допущенной к применению продукции. Целью настоящего исследования стала доработка и апробирование экспрессной и объективной инструментальной методики оценки про- и антибиотических свойств продукции, включающей различные растительные экстракты, с последующим анализом влияния указанных экстрактов на динамику биохимической активности типичных представителей микробиоты и патогенной микрофлоры человека. Предложена методика микробиотестирования, предусматривающая периодическую (через каждые 2 ч) регистрацию изменений pH, редокс-потенциала (Eh) и электропроводности жидкой питательной тестовой среды (ТС), засеянной жизнеспособными тестовыми микроорганизмами (ТМ) и инкубируемой в присутствии и в отсутствие тестируемых образцов (ТО). С помощью указанной методики был проведён сравнительный анализ про- и антибиотической активности в отношении *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus* и *Staphylococcus aureus* разных концентраций цельных докритических экстрактов, получаемых с помощью сжиженного CO₂ из 10 разных видов растительного сырья. Проведённые исследования показали, что среди ТО наиболее активные пролонгированные antimикробные свойства проявили экстракты из травы полыни таврической (*Artemisia taurica*) и багульника болотного (*Ledum palustre*), а также корней аира болотного (*Acorus calamus*) при их концентрациях в ТС от 3 об.% и выше; а наиболее активные пролонгированные пребиотические свойства проявили экстракты из ягод можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis*), корней девясила высокого (*Inula helenium*) и аира болотного (*Acorus calamus*), а также листьев

тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*) при их концентрациях в ТС равных 0,2 об.%. Начальная биологическая активность ТО в большинстве случаев была больше их пролонгированной активности. В то время как среднесрочная (по времени взаимодействия ТО с ТМ) антибиотическая активность ТО, как правило, была промежуточной по величине между их начальной и пролонгированной активностью. Таким образом, очевидно, что биологическая активность продукции, включающей РЭ, в значительной степени определяется не только составом присутствующих в этой продукции БАВ, но и их концентрацией, а также временем взаимодействия с живыми организмами (такими, как сам человек, его микробиота и т.п.) и другими факторами. Причем точный характер этих зависимостей в большинстве случаев может быть установлен лишь эмпирически, с помощью значительного числа тестовых испытаний, которые удобно проводить с помощью представленной в этой работе методики, позволяющей более экспрессно, объективно и информативно, а также менее трудоёмко и материалоёмко, чем при использовании стандартных микробиологических методов, оценивать влияние на динамику жизненной активности микроорганизмов (которая, как показано в работе, достоверно коррелирует с их биохимической активностью) различных образцов пищевой, фармацевтической, косметической и иной продукции, а также отдельных ингредиентов и добавок к ней.

Ключевые слова: микробиологическое тестирование, антибиотические свойства, экстракты растительные.

Цитирование: Сибирцев, В.С. Методика электрохимического микробиологического тестирования в применении к сравнительному анализу свойств различных растительных экстрактов / В. С. Сибирцев, У.Ю. Нечипоренко, В. Л. Кабанов, М. Ю. Кукин, М. А. Радин // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 109–124. EDN: ZZYKWQ.

Введение

В последнее время в пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях народного хозяйства всё более актуальной становится проблема разработки достаточно объективных и в то же время экспрессных и доступных для широкого применения методов количественной оценки про- и антибиотических свойств большого количества образцов как новой, так и уже допущенной к применению продукции. В последнем случае упомянутые методы являются одной из важных составляющих системы мониторинга качества и безопасности продукции. При их реализации применяются как многоклеточные, так и одноклеточные тестовые живые организмы. Причем последние используются не только как наиболее дешевая, доступная и статистически достоверная модель

живых организмов в целом; но и как модель полезной естественной микробиоты человека, а также природной микрофлоры, способной вызывать различные инфекционные заболевания, токсикозы, аллергические реакции, способствовать порче пищевой и иной продукции и т.д.

Однако принятые в настоящее время в качестве стандартных при микробиологическом тестировании процедуры оценки общей выживаемости микроорганизмов, предусматривающие визуальный подсчёт количества колоний тестовых микроорганизмов (ТМ), выросших после инкубации их на плотной питательной среде (ПС), либо измерение величины зоны задержки роста этих колоний, требуют для своего проведения значительных затрат времени, материалов и труда квалифицированного персонала, давая в результате лишь весьма неполную,

субъективную и «статичную» информацию о нарушениях жизнедеятельности тестовых организмов (Sutherland et al., 2009; Das et al., 2012; Al-Zubairi et al., 2017; Luzhnova et al., 2018; Zhuravlev, Voronchikhina, 2018). Таким образом, перспективным представляется использование в микробиологическом тестировании инструментальных технологий, среди которых наиболее простыми в исполнении, достоверными и универсальными являются сейчас различные оптические и электрохимические методы.

Авторы настоящей статьи уже достаточно давно занимаются разработкой подобных методов (Ivanov et al., 1997a, 1997b, 1999; Sibirtsev et al., 1995, 1997, 2000, 2001, 2003, 2005, 2016, 2017, 2019a, 2019b, 2019c; Sibirtsev, 2005, 2007, 2017a, 2017b; Sibirtsev, Stroev, 2019; Sibirtsev, Maslova, 2019). Однако и к настоящему времени они нуждаются в совершенствовании и коррекции под конкретные виды продукции.

В частности, в последнее время в пищевой, фармацевтической, косметической и иной продукции, производимой и потребляемой человеческим обществом, ощущается всё больший недостаток биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения, способствующих нормальному развитию и функционированию как самого человеческого организма (ослабленного стрессами, наличием различных физико-химических факторов загрязнения окружающей среды, недостатком природного освещения и физической активности, контактами с многочисленной посторонней микрофлорой и т.п.), так и симбиотически связанный с ним полезной микробиоты, либо угнетению жизнедеятельности вредной для человека микрофлоры.

Производство концентрированных синтетических аналогов этих БАВ (с целью использования их в качестве биологически активных добавок к пищевой, фармацевтической, косметической и иной продукции) при современном

уровне развития технологий часто является затратным с экономической точки зрения, а также малоэффективным вследствие сложности достижения нужной степени чистоты, стереоспецифичности и других параметров данной продукции, способных обеспечить достаточно высокую степень её биологической активности. Кроме того, растительные экстракты (РЭ) по сравнению с синтетическими средствами, как правило, обладают существенно меньшими по широте спектра и интенсивности действия на человеческий и другие живые организмы побочными эффектами.

В результате этого экстракты из различного растительного сырья в настоящее время являются одним из наиболее приемлемых и распространённых источников БАВ. РЭ достаточно широко применяются, в частности, в пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности в качестве добавок, обладающих избирательным либо малоспецифическим про- или антимикробным действием, либо добавок, обладающих различными видами нормализующего действия (используемого, в том числе, при лечении различных нервных, сердечно-сосудистых, диабетических, пищеварительных и иных заболеваний), либо консервирующих, антиоксидантных, ароматизирующих, вкусовых и иных видов добавок (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008; Sutherland et al., 2009; Tripathi et al., 2011; Das et al., 2012; Fatima et al., 2013; Alok et al., 2014; Donsi, Ferrari, 2016; Merighni et al., 2016; Radice et al., 2016; Al-Zubairi et al., 2017; Fani, Kohanteb, 2017; Rodino, Butu, 2019). Кроме того, РЭ в ряде случаев используются в качестве антисептиков, экологически безопасных инсектицидов и пестицидов, добавок к различным зуботерапевтическим, ранозаживляющим и другим медицинским и упаковочным материалам (съедобным, биоразлагаемым, обладающим выраженным antimикробным действием) и т.п. (Burt, 2004; Atarés,

Chiralt, 2016; Pavela, Benelli, 2016; Yuan et al., 2016; Ribeiro-Santos et al., 2017; Ju et al., 2019).

Из различных видов РЭ в последнее время всё более широкое применение находят экстракты, получаемые, после разрушения клеточных стенок растительного сырья, с использованием в качестве экстрагента сжиженного углекислого газа (CO₂РЭ), который затем полностью удаляется из конечного продукта за счёт изменения давления и температуры (Rout et al., 2008; Sahena et al., 2009; Ibadullaeva et al., 2015; Lazarotto et al., 2018; Vieitez et al., 2018; Coelho et al., 2018). Это обусловлено тем, что CO₂РЭ среди других видов РЭ (включая «эфирные масла») характеризуются, как правило, наибольшим разнообразием и концентрированностью входящих в их состав БАВ. Если экстрагирование проводится при давлении и температуре CO₂ выше 75 атмосфер и ниже 31 °С, то такие экстракты называются «докритическими» (поскольку CO₂ в них проявляет свойства «обычной» жидкости). В противном случае экстракты, получаемые по описываемой технологии, называются «сверхкритическими» (поскольку CO₂ в них, находясь в сверхкритическом состоянии, проявляет свойства как жидкости, так и газа). Кроме того, CO₂РЭ делятся на «селективные» и «цельные», получаемые, соответственно, при низких и высоких давлениях CO₂. Причем наиболее богаты различными БАВ «цельные докритические» CO₂РЭ, имеющие в своем составе помимо летучих компонентов (обычных для «эфирных масел») также более тяжёлые растительные смолы, парафины, пигменты и т.п. Такие экстракты, как правило, обладают вязкой пастообразной консистенцией, но легко растворяются как эфирами, так и растительными маслами (хотя в ряде случаев для их растворения требуется небольшое нагревание).

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования стала доработка и апробирование экспрессной и объективной инструменталь-

ной методики оценки про- и антибиотических свойств продукции, включающей различные растительные экстракты, с последующим анализом влияния указанных экстрактов на динамику биохимической активности типичных представителей микробиоты и патогенной микрофлоры человека.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования в настоящей работе были взяты цельные докритические экстракты, произведенные ООО «Казанский завод экстрактов» (РФ, г. Казань) с помощью сжиженного CO₂ при T = 20 °С и P = 72 атм из следующих видов растительного сырья: побеги и ягоды можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis*) (№ 1 и № 2 соответственно), молодые побеги сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) (№ 3), листья тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*) (№ 4), листья и стебли пустырника (*Leonurus cardiaca*) (№ 5), листья и стебли полыни таврической (*Artemisia taurica*) (№ 6), корни аира болотного (*Acorus calamus*) (№ 7), листья, стебли и цветы багульника болотного (*Ledum palustre*) (№ 8), корни дягиля лекарственного (*Angelica archangelica*) (№ 9), корни девясила высокого (*Inula helenium*) (№ 10). Указанный завод был выбран потому, что он является в настоящее время крупнейшим в России производителем CO₂РЭ.

Для анализа влияния различных концентраций указанных экстрактов на динамику биохимической активности типичных представителей микробиоты и патогенной микрофлоры человека использовалась следующая методика. Для каждой партии тестируемых экстрактов (ТЭ) с каждым из ТМ проводилось по 4 серии измерений. Перед началом каждой из таких серий готовилась ПС, представлявшая собой стерильный водный раствор с pH 7,2±0,2, содержащий 5 г/л глюкозы, 20 г/л белкового гидролизата и 2 г/л NaCl. При этом наличие

глюкозы ускоряло начальное развитие ТМ, обеспечивая большую экспрессность анализа. Затем указанная среда засевалась *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 либо *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (которые были выбраны в качестве ТМ, поскольку являются типичными представителями микробиоты и патогенной микрофлоры человека) и инкубировалась при $37\pm0,1$ °C без перемешивания, пока содержание клеток ТМ в ней не достигало примерно 5×10^6 кл/мл (что удостоверялось нефелометрическим способом по бактериальному стандарту мутности).

Далее полученная тестовая среда (ТС) (отличающаяся от исходной ПС наличием в ней значительного количества жизнеспособных ТМ) разливалась по тестовым измерительным ёмкостям (ИЕ) (представлявшим собой стандартные 10 мл стеклянные пробирки, заполняемые тестовой средой до половины своего объёма), в каждую из которых предварительно добавлялось (по три ИЕ в параллель) количество заданного ТЭ, необходимое для достижения заданной его концентрации в ТС. При этом в качестве контроля использовали ТС без ТЭ, также помещённые в ИЕ в трёх повторностях.

Затем как тестовые, так и контрольные ИЕ инкубировались без перемешивания при $37\pm0,1$ °C в течение 6 часов. Во время этого инкубирования с интервалом 2 часа осуществлялась регистрация pH, редокс-потенциала (Eh, мВ) и удельной, линейной, низкочастотной электропроводности (X, мСм/см) ТС, содержащихся в каждой из ИЕ. Значения pH и Eh регистрировались с помощью ионометра «Эксперт-001» (РФ) с комбинированными электродами «ЭСК-10601/7» и «ЭРП-105» соответственно. Значения X регистрировались с помощью кондуктометра «Эксперт-002» (РФ) с датчиком «УЭП-П-С», работающим на частоте 1,6 кГц.

Общие степени активирования (+) либо ингибирования (–) биохимической активности

ТМ заданными концентрациями ТЭ после k часов их совместного инкубирования в жидкой ТС ($\varepsilon_{V,k}$, %) рассчитывались по формуле:

$$\varepsilon_{V,k} = (\varepsilon_{pH,k} + 0,7\varepsilon_{Eh,k} + 0,7\varepsilon_{X,k}) / 2,4. \quad (1)$$

Величины $\varepsilon_{pH,k}$, $\varepsilon_{Eh,k}$ и $\varepsilon_{X,k}$ определялись отдельно по результатам измерений значений pH, Eh и X у ТС, содержащихся в ИЕ, в ходе инкубации этих ИЕ по формуле:

$$\varepsilon_{i,k} = 100 \times (\Delta Y_{t_{i,k}} - \Delta Y_{c_{i,k}}) / \Delta Y_{c_{i,k}}. \quad (2)$$

Здесь индекс i показывает измерения по какому параметру (pH, Eh или X) учитываются в формуле 2 (например $\varepsilon_{pH,k} = 100 \times (\Delta Y_{t_{pH,k}} - \Delta Y_{c_{pH,k}}) / \Delta Y_{c_{pH,k}}$).

Величины $\Delta Y_{t_{i,k}}$ и $\Delta Y_{c_{i,k}}$ определяются как усреднённые по выборке из N образцов с одинаковыми концентрациями экстрактов, приготовленных одинаковым способом из одного вида сырья (в нашем случае N = 3×4 = 12) изменения значений i-параметра ТС (pH, Eh или X), произошедшие за k часов от начала инкубирования этой ТС в присутствии заданной концентрации ТЭ (ΔY_t , наблюдаемое в тестовых ИЕ) либо в отсутствие ТЭ (ΔY_c , наблюдаемое в контроле). Например $\Delta Y_{t_{pH,2}} = pH_{T,2} - pH_{T,0}$, а $\Delta Y_{c_{X,4}} = X_{C,4} - X_{C,0}$ (где pH_{T,0} – значение pH среды в тестовой ИЕ в начале её инкубирования, pH_{T,2} – значение pH среды в тестовой ИЕ через 2 ч после начала её инкубирования, X_{C,0} – значение X среды в контроле в начале инкубирования, X_{C,4} – значение X среды в контроле через 4 ч после начала инкубирования) и т.д.

Коэффициенты при $\varepsilon_{i,k}$, указанные в формуле (1), были рассчитаны методами факторного анализа, аналогично тому, как описано в работах (Johnson, Jeffi, 1983; Korn, Korn, 1968) по значениям, полученным нами для $\varepsilon_{pH,k}$, $\varepsilon_{Eh,k}$ и $\varepsilon_{X,k}$ в результате применения пред-

ставленной здесь методики к оценке антибактериальной активности в отношении *E. coli* разных концентраций таких известных антисептиков и антибиотиков широкого спектра действия, как хлоргексидина биклюконат, фурацилин и левомицетин.

Ошибка определения каждой из усреднённых величин $\varepsilon_{\text{pH}, k}$, $\varepsilon_{\text{Eh}, k}$ и $\varepsilon_{\text{X}, k}$ рассчитывалась стандартным образом (Johnson, Jeffi, 1983; Korn, Korn, 1968; Sibirtsev, 2006), как $\Delta\varepsilon_Y = t_{\alpha, N-1}\sigma_Y$, с использованием критерия Стьюдента ($t_{\alpha, N-1}$ для уровня достоверности $\alpha=0,95$ и числа степеней свободы $N-1$), математического ожидания ($\varepsilon_{Y, s} = \Sigma\varepsilon_{Y, i}/N$) и его дисперсии ($\sigma_Y = [\Sigma(\varepsilon_{Y, i}-\varepsilon_{Y, s})^2 / (N-1)]^{1/2}$). После чего, исходя из стандартной формулы $\Delta z(x_i) = \sum_i(\Delta x_i \delta z / \delta x_i)$ (Johnson, Jeffi, 1983; Korn, Korn, 1968; Sibirtsev, 2006), суммарная ошибка определения величины $\varepsilon_{Y, k}$ вычислялась как $\Delta\varepsilon_{Y, k} = (\Delta\varepsilon_{\text{pH}, k} + 0,7\Delta\varepsilon_{\text{Eh}, k} + 0,7\Delta\varepsilon_{\text{X}, k}) / 2,4$.

Параметры pH, Eh и X были выбраны для оценки общей степени активирования либо ингибиции жизнедеятельности ТМ заданными концентрациями ТЭ потому, что они наиболее надёжно измеряются инструментально и при этом чувствительно связаны с тем, насколько ускоряется либо замедляется преобразование жизнедеятельными микроорганизмами, находящимися в ТС, катаболитов, присутствующих в той же ТС, в анаболиты (имеющие иные, чем у катаболитов кислотность, электропроводность и электрохимический окислительно–восстановительный потенциал).

Однако если рассматривать изменение этих параметров по отдельности, то, в частности, при росте микроорганизмов на глюкозно–белковой среде (подобной используемой в настоящей работе) потребление глюкозы вызывает закисление среды, а потребление аминокислот из белкового гидролизата – защелачивание; одновременно с этим, потреб-

ление микроорганизмами кислорода приводит к снижению Eh в область редуктивных значений и т.д. В результате чего лишь величина ε_Y , учитывающая суммарное изменение pH, Eh и X, достаточно информативно и адекватно могла характеризовать изменения метаболической активности ТМ.

Для верификации представляемой нами методики в табл. 1 приведены значения ε_s , полученные для различных концентраций ТЭ в присутствии *E. coli* с помощью «стандартной» методики микробиологического тестирования (Sutherland et al., 2009; Das et al., 2012; Al-Zubairi et al., 2017; Luzhnova et al., 2018; Zhuravlev, Voronchikhina, 2018). Последняя предусматривала визуальный подсчёт количества колоний ТМ, выросших после 24 ч инкубации их при $37\pm0,1$ °C на плотной ПС (имеющей тот же состав, что и использовавшаяся нами жидкая ПС, но с добавлением 20 г/л микробиологического агар–агара) в присутствии и в отсутствие заданных количеств ТЭ с последующим расчётом величины ε_s по формуле (2). При этом высевание проводилось для нескольких последовательных разведений ТС – каждое в несколько параллельных чашек Петри. После чего отбирались те разведения, при использовании которых на одной чашке Петри вырастало не менее 10 и не более 50 колоний ТМ. Данные по этим разведениям соответствующим образом статистически обрабатывались (Korn, Korn, 1968; Johnson, Jeffi, 1983; Sibirtsev, 2006).

Результаты и обсуждение

Наиболее интересные данные, полученные описанным выше способом применительно к объектам настоящего исследования, представлены в табл. 1–3. Представленные данные демонстрируют прежде всего то, что экстракты, полученные из разных частей разных растений, могут значительно отли-

Таблица 1. Общая степень активирования (+) либо ингибиции (–) жизнедеятельности *Escherichia coli* ATCC 25922 (ε_s , %), определявшаяся по стандартной методике микробиологического тестирования в присутствии разных количеств различных растительных экстрактов

Table 1. The overall degrees of activation (+) or inhibition (–) of the vital activity of *Escherichia coli* ATCC 25922 (ε_s , %), determined by the standard procedure of microbiological assay, in the presence of different amounts of various plant extracts

C_{TE}	Номер экстракта									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	-26	-16	-27	-25	-33	-42	-35	-34	-28	-22
1,5	-9	-6	-8	-9	-12	-13	-14	-12	-9	-7
0,5	-6	1	-6	-2	-7	-8	-5	-6	-4	-3
0,2	12	20	10	14	10	6	16	12	12	17

Примечания. Описание использованной методики тестирования см. в конце раздела «Материалы и методы». Номера РЭ соответствуют сырью, из которого их получали, указанному в начале раздела «Материалы и методы». Условные обозначения: C_{TE} (об.%) – концентрация РЭ в тестовой среде. Относительные ошибки определения величин ε_s для всех указанных в таблице значений находятся в диапазоне от 50 до 60 %.

Таблица 2. Общие степени активирования (+) либо ингибиции (–) биохимической активности *Escherichia coli* ATCC 25922 (ε_v , %), определявшиеся по разработанной инструментальной методике при разной продолжительности инкубирования тестовых микроорганизмов в присутствии разных количеств различных растительных экстрактов

Table 2. The overall degrees of activation (+) or inhibition (–) of the biochemical activity of *Escherichia coli* ATCC 25922 (ε_v , %), determined by the developed instrumental procedure, with different durations of incubation of test microorganisms in the presence of different amounts of various plant extracts

C_{TE}	k	P	Номер экстракта									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	2	90	-70	-48	-64	-69	-68	-90	-72	-76	-74	-57
	4	90	-62	-33	-57	-57	-63	-84	-65	-66	-64	-47
	6	95	-48	-29	-54	-46	-57	-77	-59	-62	-54	-40
1,5	2	90	-24	-17	-22	-24	-23	-28	-24	-26	-25	-19
	4	90	-22	-11	-19	-19	-22	-24	-22	-23	-22	-16
	6	95	-17	-10	-18	-16	-19	-23	-20	-22	-18	-13
0,5	2	90	24	32	38	25	29	24	24	24	30	22
	4	90	10	14	-2	5	1	-4	-2	2	10	10
	6	95	-10	2	-13	-4	-11	-14	-7	-11	-5	-6
0,2	2	90	52	61	46	51	33	29	39	25	47	53
	4	90	32	52	30	41	24	16	32	29	40	45
	6	95	21	36	17	26	17	10	26	22	23	30

Примечания. Описание использованной методики тестирования см. в разделе «Материалы и методы». Условные обозначения: k (ч) – продолжительность инкубирования тестовой среды; Р (%) – достоверность корреляции значений ε_v с приведёнными в табл. 1 значениями ε_s при той же C_{TE} . Остальные обозначения как в табл. 1. Относительные ошибки определения величин ε_v для всех указанных в таблице значений находятся в диапазоне от 10 до 20 %.

Таблица 3. Общие степени активирования (+) либо ингибирования (–) биохимической активности *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (ε_v , %), определявшиеся по разработанной инструментальной методике при разной продолжительности инкубирования тестовых микроорганизмов (ТМ) в присутствии разных количеств различных растительных экстрактов

Table 3. The overall degrees of activation (+) or inhibition (–) of the biochemical activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (ε_v , %), determined by the developed instrumental procedure, with different durations of incubation of test microorganisms (TM) in the presence of different amounts of various plant extracts

C_{TE}	TM	k	Номер экстракта									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	<i>L. acidophilus</i>	2	-63	-43	-61	-62	-59	-81	-63	-68	-70	-51
		6	-43	-26	-51	-41	-49	-69	-50	-56	-52	-36
	<i>S. aureus</i>	2	-57	-39	-54	-57	-53	-74	-56	-62	-63	-47
		6	-39	-24	-46	-38	-44	-63	-46	-51	-47	-33
1,5	<i>L. acidophilus</i>	2	-22	-15	-21	-22	-20	-25	-22	-24	-24	-17
		6	-15	-9	-17	-14	-16	-21	-18	-20	-17	-12
	<i>S. aureus</i>	2	-20	-14	-19	-20	-21	-23	-20	-22	-23	-16
		6	-14	-8	-16	-13	-17	-19	-16	-19	-16	-11
0,5	<i>L. acidophilus</i>	2	22	29	36	23	25	22	22	21	28	20
		6	-9	2	-12	-4	-9	-13	-6	-9	-5	-5
	<i>S. aureus</i>	2	20	26	33	21	26	20	20	22	26	18
		6	-8	2	-11	-3	-10	-11	-6	-10	-4	-5
0,2	<i>L. acidophilus</i>	2	47	55	43	46	31	26	36	23	45	48
		6	19	32	16	23	14	9	22	20	22	27
	<i>S. aureus</i>	2	43	50	40	42	29	24	34	21	41	43
		6	17	30	15	21	15	8	23	18	20	25

Примечания. Обозначения как в табл. 2. Относительные ошибки определения величин ε_v для всех указанных в таблице значений находятся в диапазоне от 10 до 20 %.

чаться друг от друга по своей биологической активности. В частности, это отчетливо видно на примере сравнения антимикробной активности экстрактов, полученных из побегов и ягод можжевельника обыкновенного, а также травы полыни таврической, для которых при их концентрации в ТС, равной 3 об.%, $\varepsilon_{v,6}$ в отношении *E. coli* составили -48 ± 7 , -29 ± 4 и -77 ± 9 % соответственно (см. табл. 2 для экстрактов № 1, № 2 и № 6). Либо на примере сравнения пребиотической активности тех же экстрактов, для которых при их концентрации в ТС, равной 0,2 об.%, $\varepsilon_{v,6}$ в отношении *E. coli* составили 21 ± 3 , 36 ± 5 и 10 ± 1 % соответственно.

Также может отличаться и активность одних и тех же экстрактов в отношении различных видов и штаммов микроорганизмов (см. табл. 2 и 3). При этом в отношении исследованных в настоящей работе РЭ наиболее чувствительной из использованных ТМ, как при кратко-, так и при долгосрочном взаимодействии с ТЭ, оказалась *E. coli*.

Кроме того, характер активности ТЭ может достаточно значительно меняться и с изменением концентраций этих экстрактов в ТС (см. табл. 1–3). В частности, у экстрактов, исследованных в настоящей работе, с уменьшением их концентрации в ТС антимикробная активность ТЭ в отношении ТМ достоверно

и монотонно уменьшалась, а пребиотическая активность, наоборот, увеличивалась. Так, например, при концентрациях 3, 1,5 и 0,2 об.% величины $\epsilon_{V,6}$ в отношении *E. coli* у экстракта из листьев, стеблей и цветов багульника болотного были равны -62 ± 7 , -22 ± 3 , и 22 ± 4 %; а аналогичные величины у экстракта из ягод можжевельника обыкновенного были равны -29 ± 4 , -10 ± 2 и 36 ± 5 % соответственно (см. табл. 2 для экстрактов № 8 и № 2).

В целом же среди исследованных экстрактов наиболее активные пролонгированные (долгосрочные) antimикробные свойства в отношении ТМ (количество характеризуемые в табл. 2 и 3 величиной $\epsilon_{V,6}$, определяемой через 6 ч инкубации ТМ в присутствии ТЭ) проявили экстракты из травы полыни таврической (№ 6), листьев, стеблей и цветов багульника болотного (№ 8) и корней аира болотного (№ 7) при их концентрациях в ТС от 3 об.% и выше. В то время как наиболее активные пролонгированные пребиотические свойства проявили экстракты из ягод можжевельника обыкновенного (№ 2), корней девясила высокого (№ 10), корней аира болотного (№ 7) и листьев тысячелистника обыкновенного (№ 4) при их концентрациях в ТС, равных 0,2 об.%.

Начальная (краткосрочная) микробиологическая активность ТЭ (количество характеризуемая в табл. 2 и 3 величиной $\epsilon_{V,2}$, определяемой через 2 ч инкубации ТМ в присутствии ТЭ) в большинстве случаев была достоверно больше их пролонгированной активности. Это объяснялось, вероятно, как адаптацией ТМ к присутствию ТЭ, так и уменьшением с течением времени активности и общего количества БАВ, содержащихся в ТЭ, приходящегося на один ТМ.

Среднесрочная (по времени взаимодействия ТЭ с ТМ) микробиологическая активность ТЭ (количество характеризуемая

в табл. 2 величиной $\epsilon_{V,4}$, определяемой через 4 ч инкубации ТС с ТЭ) в большинстве случаев была промежуточной по величине между $\epsilon_{V,2}$ и $\epsilon_{V,6}$ и лишь иногда (как, например, в случае экстракта № 8 в концентрации 0,2 об.%) превышала как $\epsilon_{V,2}$, так и $\epsilon_{V,6}$ тех же ТЭ.

Кроме того, из сопоставления значений величин ϵ_S и ϵ_V , полученных для одинаковых концентраций одних и тех же ТЭ и приведённых в табл. 1 и 2, видно, что представляемый нами инструментальный метод микробиологического тестирования, позволяя получать результаты, с 90–95 % достоверностью коррелирующие с аналогичными результатами, получаемыми с помощью «стандартного» визуального метода микробиологического тестирования (приведёнными в табл. 1), имеет по сравнению с последним существенно меньшую длительность (требуя для своего проведения от 3 до 7 ч вместо 26 ч по «стандартному» методу), материалоёмкость и трудоёмкость (т.к. для проведения «стандартного» метода необходимо большое количество разведений ТС, использование для каждого разведения значительных объёмов плотных ПС, визуальный подсчёт колоний ТМ, выросших на этих средах и т.п.). Кроме того, для величины ϵ_S , определяемой «стандартным визуальным» методом микробиологического тестирования, характерна значительно большая ошибка измерения, чем для величины ϵ_V , определяемой представленным здесь инструментальным микробиотестовым методом. Помимо этого, для каждой концентрации каждого из ТЭ представленным здесь инструментальным методом можно было получить как минимум три (а при необходимости, и больше) значения ϵ_V (отражающие временную динамику изменения ϵ) вместо всего лишь одного значения ϵ_S , получаемого «стандартным визуальным» методом микробиологического тестирования. И наконец,

представленная здесь инструментальная методика микробиологического тестирования даёт гораздо больше возможностей для автоматизации всего процесса анализа по сравнению с аналогичными «стандартными визуальными» методами его проведения.

Заключение

Таким образом, мы убедились что с помощью представленной в настоящей работе методики можно значительно более экспрессивно (в течение нескольких часов, а не суток), объективно (за счёт уменьшения роли субъективного человеческого фактора при замене в процессе измерений визуальных методов на инструментальные) и информативно, чем при использовании стандартных методов, оценивать влияние на динамику жизненной активности ТМ различных образцов пищевой, фармацевтической, косметической и иной продукции, в том числе включающей РЭ. При этом большая информативность представленной методики достигается за счёт того, что, во-первых, инструментальные способы измерения чувствительней визуальных (применяемых в стандартных микробиологических методах); во-вторых, представленная методика даёт возможность оценивать динамику изменения биохимической активности микроорганизмов на множестве произвольно выбираемых временных отрезков (в отличие от стандартных микробиологических процедур, где измерения производятся лишь один раз, в конце периода инкубации ТО); в-третьих, как видно из сопоставления данных, приведённых в табл. 1 и 2, динамика изменения биохимической активности ТМ, определяемая предлагаемым нами методом, достоверно коррелирует с динамикой изменения скорости размножения тех же микроорганизмов в присутствии тех же концентраций тех же ТО, оцениваемой стандартным мето-

дом; и в-четвёртых, представляемая нами методика предполагает оценку изменения активности микроорганизмов сразу по нескольким независимым показателям (таким как pH, редокс-потенциал и электропроводность ТС), а не только по одному (мутности ТС, числу колоний ТМ или величине зоны задержки их роста), как в случае применения стандартных микробиологических методик. Кроме того, представленная здесь методика существенно менее материалоёмка и трудоёмка по сравнению с аналогичными стандартными методами, а также даёт гораздо больше возможностей для автоматизации всего процесса анализа.

Всё это делает представленную методику значительно более доступной для массового применения, чем ранее используемые стандартные методы микробиологического тестирования образцов различной продукции. Последнее же является весьма актуальным в свете того, что одним из важных условий обеспечения должного уровня безопасности и качества жизни людей является не только своевременное и качественное тестирование про- и антибиотических свойств новой продукции (ассортимент которой всё увеличивается, а сроки появления сокращаются); но и постоянный широкий мониторинг этих свойств у уже допущенной к массовому потреблению продукции с целью выявления недоброкачественных, либо успевших до окончательной реализации испортиться или претерпеть химическое или биологическое заражение её образцов.

В отношении же исследованных нами РЭ следует отметить следующее. Как мы убедились, РЭ, полученные из разных частей разных растений разными способами, могут значительно отличаться друг от друга по своей биологической активности. Кроме того, характер биологической активности РЭ может

значительно изменяться и при изменении их концентрации в ТС, а также времени взаимодействия с живыми организмами, времени и Т хранения РЭ и т.п.

В частности, среди исследованных экстрактов наиболее активные пролонгированные (долгосрочные) антимикробные свойства проявили экстракты из травы полыни таврической, листьев, стеблей и цветов багульника болотного, а также корней аира болотного при их концентрациях в ТС от 3 об.% и выше. В то время как наиболее активные пролонгированные пребиотические свойства проявили экстракты из ягод можжевельника обыкновенного, корней девясила высокого, корней аира болотного и листьев тысячелистника обыкновенного при их концентрациях в ТС, равных 0,2 об.%.

Начальная микробиологическая активность ТЭ в большинстве случаев была достоверно больше их пролонгированной активности. Среднесрочная (по времени взаимодействия ТЭ с ТМ) микробиологическая

активность ТЭ, как правило, была промежуточной по величине и лишь иногда превышала не только пролонгированную, но и начальную активность тех же ТЭ. С уменьшением концентраций ТЭ в ТС их антимикробная активность монотонно уменьшалась, а пребиотическая активность увеличивалась.

Таким образом, очевидно, что характер про- и антибиотической активности пищевой, кормовой, фармацевтической, косметической и иной продукции, включающей РЭ, в значительной степени определяется не только составом присутствующих в этой продукции БАВ, но и их концентрацией, а также временем взаимодействия с живыми организмами (такими, как сам человек, его микробиота и т.п.) и другими факторами. Причем точный характер этих зависимостей в большинстве случаев может быть установлен лишь эмпирически, с помощью значительного числа тестовых испытаний (которые удобно проводить с помощью представленной в этой работе методики).

Список литературы / References

- Alok S., Jain S. K., Verma A., Kumar M., Mahor A., Sabharwal M. (2014) Herbal antioxidant in clinical practice: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1): 78–84
- Al-Zubairi A. S., Al-Mamary M. A., Al-Ghasani E. (2017) The antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of essential oil from different aromatic plants. *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 6(9): 224–233
- Atarés L., Chiralt A. (2016) Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 48: 51–62
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446–475
- Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223–253
- Coelho J., Veiga J., Karmali A., Nicolai M., Reis C. P., Nobre B., Palavra A. (2018) Supercritical CO₂ extracts and volatile oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) comparison with conventional methods. *Separations*, 5(2): 21
- Das S., Anjeza C., Mandal S. (2012) Synergistic or additive antimicrobial activities of Indian spice and herbal extracts against pathogenic, probiotic and food-spoiler micro-organisms. *International Food Research Journal*, 19(3): 1185–1191

- Donsi F., Ferrari G. (2016) Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233: 106–120
- Fani M., Kohanteb J. (2017) In vitro antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* essential oil against major oral pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(4): 660–666
- Fatima A., Alok S., Agarwal P., Singh P. P., Verma A. (2013) Benefits of herbal extracts in cosmetics: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(10): 3746–3760
- Ibadullaeva G. S., Pichkhadze G. M., Ustenova G. O., Dil'barkhanov R., Tikhonova S. A., Grud'ko V. A., Bevz N. Yu., Yudina Yu. V. (2015) Chemical composition of the CO₂-extract of *Acorus calamus* obtained under subcritical conditions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 49(6): 388–392
- Ivanov S. D., Korytova L. I., Yamshanov V. A., Ilyin N. V., Sibirtsev V. S. (1997a) Leukopenia prognosis by radiation therapy of patients with Hodgkin's disease. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 16(2): 183–188
- Ivanov S. D., Korytova L. I., Yamshanov V. A., Ilyin N. V., Sibirtsev V. S. (1997b) Leukopenia prognosis during radiation therapy in patients with Hodgkin's disease. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 16(4): 413–418
- Ivanov S. D., Kovalenko A. L., Kovan'ko E. G., Iamshanov V. A., Akimov A. A., Zabzhinskii M. A., Sibirtsev V. S. (1999) The use of cycloferon in experimental radiotherapy of tumors. *Voprosy onkologii*, 45(3): 292–297
- Johnson K., Jeffi V. (1983) *Numerical methods in chemistry*. New York, Cambridge University Press, 235 p.
- Ju J., Xie Y., Guo Y., Cheng Y., Qian H., Yao W. (2019) Application of edible coating with essential oil in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15): 2467–2480
- Korn G., Korn T. (1968) *Mathematical handbook for scientists and engineers. Definitions, theorems and formulas for reference and review*. McGraw Hill Book Company, 356 p.
- Lazarotto M., Valério A., Boligon A., Tres M. V., Scapinello J., Dal Magro J., Oliveira J. V. (2018) Chemical composition and antibacterial activity of bergamot peel oil from supercritical CO₂ and compressed propane extraction. *Open Food Science Journal*, 10: 16–23
- Luzhnova S. A., Tyrkov A. G., Gabitova N. M., Yurtaeva E. A. (2018) Synthesis and antimicrobial activity of 5-(arylmethylidene)-2,4,6-pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-triones. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 52(6): 506–509
- Merghni A., Marzouki H., Hentati H., Aouni M., Mastouri M. (2016) Antibacterial and antibiofilm activities of *Laurus nobilis* L. essential oil against *Staphylococcus aureus* strains associated with oral infections. *Current Research in Translational Medicine*, 64(1): 29–34
- Pavela R., Benelli G. (2016) Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12): 1000–1007
- Radice M., Manfredini S., Ziosi P., Dissette V., Buso P., Fallacara A., Vertuani S. (2016) Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia*, 114: 144–162
- Ribeiro-Santos R., Andrade M., de Melo N. R., Sanches-Silva A. (2017) Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 61: 132–140

- Rodino S., Butu M. (2019) Herbal extracts-new trends in functional and medicinal beverages. *Functional and medicinal beverages. Volume II. The science of beverages*. Academic Press, p. 73–108
- Rout P.K., Naik S.N., Rao Y.R. (2008) Subcritical CO₂ extraction of floral fragrance from *Quisqualis indica*. *Journal of Supercritical Fluids*, 45(2): 200–205
- Sahena F., Zaidul I.S. M., Jinap S., Karim A. A., Abbas K. A., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2009) Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – a review. *Journal of Food Engineering*, 95(2): 240–253
- Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. (1995) Mechanisms for changing fluorescent properties of bis-benzimidazole dyes. *Bioorganicheskaya khimiia*, 21(9): 731–736
- Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. (1997) Spectral properties of bisbenzimidazole dyes upon interaction with DNA. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 23(12): 857–865
- Sibirtsev V.S., Glibin E.N., Ivanov S.D. (2000) Variation of spectral properties of actinocin derivatives due to equilibrium transformations. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 36(12): 1812–1818
- Sibirtsev V.S., Garabadzhiu A.V., Ivanov S.D. (2001) Comparative study of DNA-specific dyes of the indole and benzimidazole series. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 27(1): 57–65
- Sibirtsev V.S., Tolmachev A. Yu., Suslov V.V., Garabadzhiu A.V., Traven' V. F. (2003) Dependence of fluorescence properties of compounds from psoralen, angelicin, and carbazole series on the character of their terminal substituents. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 39(6): 881–889
- Sibirtsev V.S. (2005) Study of applicability of the bifunctional system “Ethidium bromide + Hoechst-33258” for DNA analysis. *Biochemistry (Moscow)*, 70(4): 449–457
- Sibirtsev V.S., Tolmachev A. Yu., Kovaleva M.V., Garabadzhiu A.V., Traven V.F. (2005) Spectral study of interactions of 4,8,4'-trimethylpsoralen and 4,4'-dimethylangelicin dyes with DNA. *Biochemistry (Moscow)*, 70(7): 822–832
- Sibirtsev V.S. (2006) Analysis of benzo[a]pyrene deactivation mechanisms at rats. *Biochemistry (Moscow)*, 71(1): 90–98
- Sibirtsev V.S. (2007) Fluorescent DNA probes: study of mechanisms of changes in spectral properties and features of practical application. *Biochemistry (Moscow)*, 72(8): 887–900
- Sibirtsev V.S., Naumov I. A., Kuprina E. E., Olekhovich R. O. (2016) Use of impedance biotesting to assess the actions of pharmaceutical compounds on the growth of microorganisms. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 50(7): 481–485
- Sibirtsev V.S. (2017a) Investigation of mechanisms of change in spectral properties during interaction of benzazole, indole, and phenanthridium compounds with DNA. *Journal of Optical Technology*, 84(5): 294–301
- Sibirtsev V.S. (2017b) Biological test methods based on fluorometric genome analysis. *Journal of Optical Technology*, 84(11): 787–791
- Sibirtsev V.S., Olekhovich R.O., Samuylova E.O. (2017) Assessment of integral toxicity of water resources by instrumental methods of analysis. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management, SGEM*, 17(61): 507–514
- Sibirtsev V.S., Stroev S.A. (2019) New optical-electrochemical microbiotesting system for valuation of oil products toxicsafety. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 19(1): 74–81 (in Russian)

- Sibirtsev V.S., Maslova A. Yu. (2019) Complex research of *E.coli* vital activity dynamics in presence of transition metal ions. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 19(2): 236–241 (in Russian)
- Sibirtsev V.S., Uspenskaya M. V., Garabadgiu A. V., Shvets V.I. (2019a) An integrated method of instrumental microbiotesting of environmental safety of various products, wastes, and territories. *Doklady Biological Sciences*, 485(1): 59–61
- Sibirtsev V. S., Garabadgiu A. V., Shvets V. I. (2019b) Fluorescent DNA probes: study of properties and methods of application. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 489(1): 403–406
- Sibirtsev V. S., Garabadgiu A. V., Shvets V. I. (2019c) New method of integrated photofluorescence microbiotesting. *Doklady Biological Sciences*, 489(1): 196–199
- Sutherland J., Miles M., Hedderley D., Li J., Devoy S., Sutton K., Lauren D. (2009) In vitro effects of food extracts on selected probiotic and pathogenic bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(8): 717–727
- Tripathi A.K., Bhoyar P.K., Baheti J.R., Biyani D.M., Khalique M., Kothmire M.S., Amgaonkar Y.M., Bhanarkar A.B. (2011) Herbal antidiabetics: a review. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2(1): 30–37
- Vieitez I., Maceiras L., Jachmanián I., Alborés S. (2018) Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *Journal of Supercritical Fluids*, 133: 58–64
- Yuan G., Chen X., Li D. (2016) Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Research International*, 89: 117–128
- Zhuravlev O.E., Voronchikhina L.I. (2018) Synthesis and antimicrobial activity of n-decylpyridinium salts with inorganic anions. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 52(4): 312–315