ISSN 2311-9322 (Print), ISSN 2311-9330 (Online)

Biology in Agriculture

Биология в сельском хозяйстве

№3, 2019

Научно-практический и теоретический журнал



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Орловский государственный аграрный университет имени Н. В. Парахина»

Фундаментальные и прикладные исследования по селекции, генетике, биотехнологии, физиологии, этологии, микробиологии и многим другим отраслям современной науки

scientia, virtus, libertas

≡ Russian Federation ≡

Учредитель и издатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н. В. Парахина»

Главный редактор:
А.И. Шендаков,
доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
член Союза писателей России

Редакционная коллегия:
С.А. Родимцев (председатель), д. т.н., профессор (г. Орёл)
В.С. Буяров, д. с.-х. н., профессор (г. Орёл)
И.А. Егоров, д. б.н., проф., академик РАН (г. Москва)
А.С. Делян, д. с.-х. н., профессор (г. Москва)
Л.В. Калашникова, д. филолог. наук, профессор (г. Орёл)
С.И. Кононенко, д. с.-х. н., профессор (г. Краснодар)
А.А. Коровушкин, д. биол. н., профессор (г. Рязань)
С.Д. Князев, д. с.-х. н., профессор (г. Орёл)
В.И. Крюков, д. биол. н., профессор (г. Орёл)
Р.Н. Ляшук, д. с.-х. н., профессор (г. Орёл)
В.В. Обливанцов, д. с.-х. н., профессор (г. Севастополь)
С.Н. Харитонов, д. с.-х. н., профессор (г. Москва)
M.A. Shariati, Islamic Azad University (г. Тегеран)

Содержание

стр.

Актуальные вопросы частной зоотехнии, генетики и физиологии животных

Крюков В.И., Власова Е.Ю. Влияние гиповитаминоза на частоту микроядер в эритроцитах периферической крови индейки домашней (*Meleagris gallopavo*) (***Kryukov V.I., Vlasova E.Y.*** *Effect of hypovitaminosis on the frequency of the micronuclei in turkey's (Meleagris gallopavo) peripheral blood erythrocytes*)……. 2

Мурленков Н.В., Шендаков А.И. Переваримости питательных веществ и морфо-биохимический статус телят при скармливании пробиотиков (***Murlenkov N.V., Shendakov A.I.*** *Digestibility of nutrients and morpho-biochemical status of calves when feeding probiotics*)…….. 10

Глазкова Н.Ю. Иммуногенетический полиморфизм у коров чёрно-пёстрой породы ФГУП «Стрелецкое» Орловской области (***Glazkova N.YU****., Immunogenetic polymorphism in cows of Black-and-White breed from FSUE «Streletskiy» in Orel region*)……. 14

Современные проблемы экологии

Хаффаресcас Ясин Идентификация видов цианобактерий, населяющих побережье Алжира (***Haffaressas Yacine*** *Identification of Cyanobacteria species that populate the Algerian coasts)*…….. 17

Биологические факторы безопасности агропромышленного производства

Шендакова Т.А Биологические производственные факторы в структуре профессионального риска работников животноводства (***Shendakova T.A.*** *Biological production factors in the structure of professional risk of livestock workers)*…….. 26

Адрес издателя и редакции: 302019, Россия, г. Орёл, ул. Генерала Родина, д. 69
Свидетельство о регистрации СМИ выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), ПИ №ФС 77-70557 от 03.08.2017 г. (предыдущее свидетельство ПИ №ФС 77-54372 от 29.05.2013 г.)

Отпечатано в издательстве ФГБОУ ВО Орловский ГАУ. **Адрес издательства** (типографии): 302028, г. Орёл, бульвар Победы, 19, лицензия ЛР№021325 от 23.02.1999 г.
Язык: русский, английский
Телефон: гл. редактор – 8-953-816-78-84, **факс:** +7 (4862) 76-41-01
E-mail: bio413@ya.ru (для материалов), aish78@yandex.ru (для переписки)
Сдано в набор: 04.09.2019 г. **Подписано в печать:** 17.09.2019 г.
Дата выхода: 25.09.2019 **г.**
Периодичность выхода, объём: 4 раза в год, до 100 страниц, А4.
Тираж: 300 экземпляров. Цена свободная.
Формат: 60x84/8. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.
Фото на обложке: опытные поля в Орловской области (автор Д.Б. Бородин)
Мнение редакции может не совпадать с мнением авторов.
Перепечатка материалов с письменного разрешения главного редактора.

© ФГБОУ ВО Орловский ГАУ, 2019

УДК 636.5.033 : 636.064.6 : 576.356.2

Крюков В.И., доктор биологических наук, профессор,
Власова Е.Ю., студентка 5 курса,
ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет
им. Н.В. Парахина», Россия, г. Орёл
тел. 8 (4862) 47 51 71, e-mail: iniic@mail.ru

Kryukov V.I., Doctor of Biological Sciences, Professor
Vlasova E.Y., the student 5 rates
Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education
«Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin», Orel, Russia

ВЛИЯНИЕ ГИПОВИТАМИНОЗА НА ЧАСТОТУ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ИНДЕЙКИ ДОМАШНЕЙ (*MELEAGRIS GALLOPAVO*)

(Effect of hypovitaminosis on the frequency of the micronuclei in turkey's (*Meleagris gallopavo*) peripheral blood erythrocytes)

Высокая продуктивность сельскохозяйственной птицы может быть достигнута лишь при рациональном кормлении, обеспечивающим их биохимический гомеостаз, стабильность генома и нормальную работу эпигенетических механизмов. В статье изложены результаты анализа цитогенетических нарушений в эритроцитах периферической крови 6-недельных индюшат трёх групп, получавших разное количество витаминов групп А, D_3 и Е. Птицы первой группы с 37-го по 41-й день развития получали полный рацион кормления, содержащий поливитаминную добавку «Алфавит $АД_3Е$». Индейки второй группы получали тот же рацион, но со сниженным на 50% от нормы количеством поливитаминной добавки. Из рациона птиц третьей группы поливитаминная добавка была полностью исключена. На 43-й день у всех птиц была взята кровь и сделаны мазки. В окрашенных азур-эозином по Романовскому препаратах анализировали частоту эритроцитов с микроядрами и аномалиями ядер (почкующихся, двухлопастных, выемчатых, хвостатых). Установлен рост частот ядерных аномалий с уменьшением количества поливитаминной добавки в рационе. Частоты эритроцитов с микроядрами в первой, второй и третей группах птиц составили 0,85, 1,11 и 1,13‰, соответственно. Частоты микроядер в первой и третьей группах имели статистически достоверные различия (P≤0,05). Суммарные частоты всех других ядерных аномалий в группах были равны 0,56, 1,19 и 1,49%, соответственно. Две последние величины статистически достоверно отличались от первой (P≤0,05). На основании полученных данных сделан вывод о снижении уровня стабильности генома индеек при недостатке витаминов А, D_3 и Е в их рационе.

Ключевые слова: эритроциты, микроядра в эритроцитах, периферическая кровь, гиповитаминоз

High productivity of poultry can be achieved only with the rational feeding of birds, which provides biochemical homeostasis, genome stability and normal functioning of epigenetic mechanisms. This article presents the results of an analysis of cytogenetic disorders in peripheral blood erythrocytes of 6-week-old turkeys of three groups that received different amounts of vitamins of groups A, D_3, and E. Birds of the first group received a complete feeding ration containing the multivitamin supplement «Alphabet AD_3E» from the 37th to the 41st day of development. Turkeys of the second group received the same diet, but the amount of multivitamin supplement in it was reduced by 50% from the norm. The multivitamin supplement was completely excluded from the diet of birds of the third group. Blood samples were taken from all birds and smears were made on the 43rd day. Slides were stained with azure-eosin according to Romanovsky. The frequency of erythrocytes with micronuclei and anomalies of the nuclei (budding, two-lobed, notched, caudate) was analyzed. The test results showed an increase in the frequency of nuclear abnormalities with a decrease of the multivitamin supplement amount in the diet. The frequencies of erythrocytes with micronuclei in the first, second, and third groups of birds were 0.85, 1.11, and 1.13‰, respectively. The micronucleus frequencies in the first and third groups had statistically significant differences (P≤0.05). The total frequencies of all other nuclear anomalies in the groups were 0.56, 1.19, and 1.49%, respectively. The last two values were statistically significantly different from the first value (P≤0.05). Based on the data obtained, it was concluded that a decrease in the amount of vitamins A, D3 and E in the diet reduces the level of stability of the turkey genome.

Keywords: red blood cells, microkernels in red blood cells, peripheral blood, hypovitaminosis

Введение. В настоящее время Россия оказалась самым быстроразвивающимся производителем мяса индейки с рекордно высоким за последние десять лет среднегодовым темпом прироста (25%). Общий объем производства мяса индейки в России в 2018 году превысил 259 тыс. тонн. Это на 28 тыс. тонн (12%) больше, чем в 2017 году. В 2019 г. аналитики прогнозируют прирост российского производства мяса индейки на 70-80 тыс. тонн, т.е. до 330-340 тысяч тонн. [1]. Вместе с тем, сложные экономические условия, в которых на современном этапе вынуждены функционировать птицеводческие предприятия страны, застав-

ляют изыскивать пути снижения затрат на выращивание птиц. Одним из путей уменьшения таких затрат руководство одной из птицефабрик рассматривало уменьшение количества в рационе птиц дорогостоящих импортных кормовых витаминных добавок. Однако многие витамины в организме птиц не синтезируются и должны поступать с кормом, т.к. биологически необоснованное уменьшение физиологически активных компонентов в кормах может приводить к серьёзным нарушениям биохимического гомеостаза и ослаблению репарационных процессов в клетках. Поэтому руководство птицефабрики перед принятием им решений об изменении рациона кормления птиц предложило группе сотрудников Орловского аграрного университета изучить возможные последствия этих изменений.

Значение витаминов для сохранения биохимического гомеостаза и регуляции физиологических процессов организмов исследовано достаточно подробно. Роль витаминов в регуляции интенсивности мутагенеза изучено существенно слабее. К тому же, большая часть таких исследований выполнена с использованием бактериальных культур и лабораторных млекопитающих. Исследований на птицах существенно меньше. И лишь только небольшая часть из них выполнена с использованием цитогенетических методов. Одним из них является метод анализа частот возникновения в клетках микроядер, а также ряда других аномалий морфологии ядра.

Микроядра в клетках живых организмов представляют собой небольшие содержащие хроматин структуры, расположенные отдельно от основного ядра клетки. Они образуются из фрагментов хромосом или целых хромосом, которые оказались не связанными с нитями веретена деления. В результате эти хромосомы или их фрагменты остаются в цитоплазме, вне образующихся новых ядер. Причиной возникновения микроядер могут быть различные внутренние и внешние факторы. Присутствие микроядер в клетках свидетельствует о генотоксическом стрессе и/или генетической нестабильности организма. Микроядерный тест широко используется при исследованиях мутагенеза у человека [2]. Методики анализа микроядер в различных тканях для целей медицинских исследований в значительной степени стандартизированы. В ветеринарной практике это предстоит ещё сделать.

Выполненный нами поиск публикаций по микроядерному тестированию сельскохозяйственных птиц позволил обнаружить лишь одно сообщение о спонтанной частоте образования микроядер в эритроцитах трёх индеек в Мексике [3]. Таким образом, для индеек пока отсутствуют научные сведения о межпородных, половых и возрастных различиях частот спонтанного образования микроядер у здоровых птиц. Если у человека, помимо частот спонтанного мутагенеза у здоровых индивидуумов, изучены частоты образования микроядер в клетках при самых различных заболеваниях [4], то для индеек данные о частотах микроядер, образующихся при различных их патологических состояниях, в том числе – при гиповитаминозах, полностью отсутствуют. Отсутствие таких сведений делает полученные нами данные очень актуальными.

Цель и задачи исследования

Целью данного исследования являлся анализ возможных генетических последствий уменьшения количества этих витаминов в рационе индеек путём анализа частот формирования микроядер и других ядерных аномалий в эритроцитах периферической крови полуторамесячных индюшат, выращенных при полном рационе питания и при рационах с пониженным содержанием поливитаминной добавки. В соответствии с целью были определены задачи – изучить: а) спонтанную частоту образования микроядер и ядерных аномалий в эритроцитах периферической крови индюшат при полном рационе кормления, содержащим добавки витаминов А, D_3, Е; б) частоту образования микроядер в эритроцитах периферической крови самцов индеек при снижении в их рационе количества поливитаминной добавки на 50% от нормы, а также при полном отсутствии поливитаминной добавки в рационе.

Материалы и методы исследования

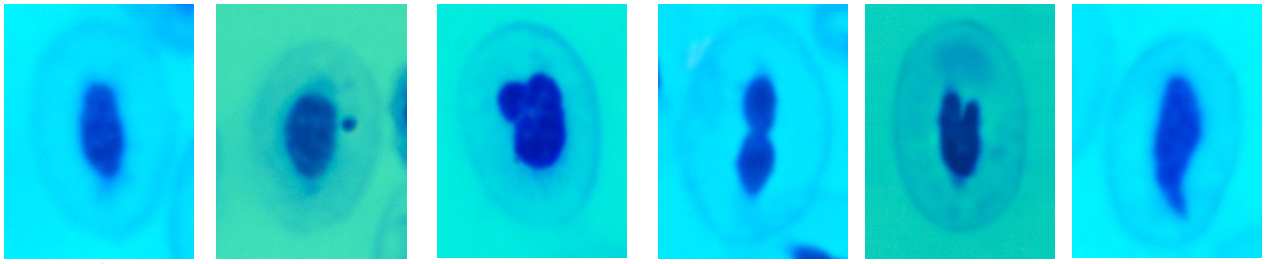
Эксперимент был выполнен в марте 2019 г. на базе птицеводческой фабрики ЗАО «Краснобор» (пос. Рассвет, Тульская обл.). Материалом для исследования служили самцы индейки домашней (*Meleagris gallopavo f. domestica*) породы Big-6. Всех птиц до начала эксперимента выращивали при стандартных условиях содержания и кормления. Из 36-дневных здоровых птиц общего поголовья были сформированы три экспериментальные группы по 8 самцов в каждой. Птицы 1-ой (контрольной) группы получали полный кормовой рацион, в том числе витаминный препарат «Алфавит $АД_3Е$», задаваемый птицам методом выпойки из расчёта 0,5 л/1000 л воды в течение 5 дней (с 37-го по 41-й дни развития). Птицы 2-ой (опытной) группы получали полный кормовой рацион, но витаминный препарат «Алфавит $АД_3Е$» давали птицам в указанные выше сроки в половинной дозе – из расчёта 0,25 л/1000 л воды. Птицы 3-ей (опытной) группы получали стандартный кормовой рацион, но без витаминного препарата «Алфавит $АД_3Е$». «Алфавит $АД_3Е$» – коммерческое название комплексного препарата жирорастворимых витаминов на водной основе. В 1 мл препарата содержится витамина А – 50 000 МЕ, витамина D_3 – 5000 МЕ, витамина Е – 30 мг.

В связи с одновременным проведением биохимических исследований индеек всех трёх групп, кровь для анализа у птиц брали на 8 день после начала эксперимента (утро 43-х суток индивидуального развития индюшат) из подкрыльцовой вены, используя для каждой особи индивидуальный одноразовый шприц. Каплю цельной крови наносили на обезжиренное предметное стекло и стандартным методом делали мазок [5]. В лаборатории мазки крови фиксировали в 96%-ном этаноле в течение 30 мин и высушивали. Фиксированные препараты окрашивали 2%-ным красителем Гимза по Романовскому. Окрашенные препараты промывали в проточной воде в течение 15 мин, трижды ополаскивали дистиллированной водой и высушивали. Мазки анализировали, используя микроскоп «AxioImager A1» («Zeiss», Германия) с цифровой

видеокамерой «ProgRes CF» и программным обеспечением «Видеотест-Морфология 5.0». В мазке крови каждой птицы анализировали не менее 3000 эритроцитов. По техническим причинам мазки крови были проанализированы у 7 птиц каждой исследуемой группы. Таким образом, выборка проанализированных эритроцитов для каждой из трёх групп индюшат была более 21 тыс. клеток.

Анализ ядерных аномалий в эритроцитах был выполнен в соответствии с классификацией, представленной в работе [6]. Учитываемые эритроциты показаны на рис. 1: помимо нормальных эритроцитов (А) учитывали эритроциты с микроядрами (Б), а также с аномальными ядрами: почкующимися (В), двулопастными (Г), выемчатыми (Д) и хвостатыми (Е).

Достоверность различий в частотах нарушений между вариантами опыта определяли после φ-преобразования частот аномалий [7, с. 166-169]. Все расчёты были выполнены с использованием электронных таблиц MS Excel. В итоговых таблицах частоты нормальных эритроцитов и сумма долей всех аномалий указаны в процентах, индивидуальные частоты аномалий – в ‰ (промилле).



А Б В Г Д Е

Рис. 1. Нормальный эритроцит (А), эритроцит с микроядром (Б) и эритроциты с аномальными ядрами: почкующимся (В), двулопастным (Г), выемчатым (Д) и хвостатым (Е).

Результаты и обсуждение

При исследовании микроядер и ядерных аномалий в эритроцитах птиц других видов было обнаружена широкая индивидуальная изменчивость частот анализируемых показателей [8, 9], причины которой ещё предстоит исследовать. В связи с этим полученные нами результаты микроскопического анализа эритроцитов в мазках крови индюшат трёх исследованных групп представлены для каждой исследованной особи (табл. 1-3). По этим данным рассчитаны частоты клеток с микроядрами и другими ядерными аномалиями (табл. 4).

Таблица 1 – Количества нормальных и аберрантных эритроцитов у птиц 1-й группы, получавших полный рацион, включающий полную дозу кормовой добавки «Алфавит АД$_3$Е»

Эритроциты	Номер птицы в исследованной выборке							Сумма
	1	2	3	4	5	6	7	
С нормальными ядрами	3135	3316	3196	3201	3221	3117	5463	24649
С микроядрами	2	3	2	3	3	2	6	21
С почкующимися ядрами	3	1	1	2	4	2	6	19
С двулопастными ядрами	0	0	1	0	0	0	2	3
С выемкой в ядре	12	18	8	9	6	4	14	71
С хвостатым ядром	1	0	0	1	2	1	0	5
С неклассифицированным аномалиями	3	5	2	4	1	3	3	21
Всего клеток с аномалиями	21	27	14	19	16	12	31	140
Всего эритроцитов	3156	3343	3210	3220	3237	3129	5494	24789

Таблица 2 – Количества нормальных и аберрантных эритроцитов у птиц 2-й группы, получавших полный рацион, включающий половинную дозу кормовой витаминной добавки «Алфавит АД$_3$Е»

Эритроциты	Номер птицы в исследованной выборке							Сумма
	1	2	3	4	5	6	7	
С нормальными ядрами	5002	3495	3319	3074	3568	3164	3887	25509
С микроядрами	4	5	3	5	3	2	4	26
С почкующимися ядрами	5	3	1	4	5	4	6	28
С двулопастными ядрами	2	3	1	2	4	2	1	15
С выемкой в ядре	29	24	19	22	26	11	19	150
С хвостатым ядром	0	2	4	3	3	2	1	15
С неклассифицированным аномалиями	19	7	11	9	14	8	6	74
Всего клеток с аномалиями	59	44	39	45	55	29	37	308
Всего эритроцитов	5061	3539	3358	3119	3623	3193	3924	25817

Таблица 3 – Количества нормальных и аберрантных эритроцитов у птиц 3-й группы, получавших стандартный рацион, но без кормовой витаминной добавки «Алфавит АДзЕ»

Эритроциты	Номер птицы в исследованной выборке							Сумма
	1	2	3	4	5	6	7	
С нормальными ядрами	5413	3373	3346	3350	3116	3479	4161	26238
С микроядрами	5	4	5	6	1	5	4	30
С почкующимися ядрами	8	4	5	6	7	9	4	43
С двулопастными ядрами	3	2	1	4	4	5	5	24
С выемкой в ядре	29	23	21	36	16	24	31	180
С хвостатым ядром	3	1	5	4	6	4	3	26
С неклассифицированным аномалиями	18	9	7	19	17	10	13	93
Всего клеток с аномалиями	66	43	44	75	51	57	60	396
Всего эритроцитов	5479	3416	3390	3425	3167	3536	4221	26634

Таблица 4 – Средние частоты эритроцитов с нормальными и аномальными ядрами в периферической крови индеек трёх исследованных групп

Частота эритроцитов	Исследованные группы индеек		
	1 группа	2 группа	3 группа
Нормальных, %	99,44 ±0,03	98,81 ±0,04	98,51 ±0,05
Аномальных, % , в том числе (в промилле):	0,56 ±0,003	1,19 ±0,04	1,49 ±0,05
С микроядрами, ‰	0,85 ±0,11	1,11 ±0,12	1,13 ±0,13
С почкующимися ядрами, ‰	0,77 ±0,10	1,08 ±0,12	1,61 ±0,16
С двулопастными ядрами, ‰	0,12 ±0,05	0,58 ±0,10	0,90 ±0,12
С выемкой в ядре, ‰	2,86 ±0,20	5,81 ±0,28	6,76 ±0,31
С хвостатым ядром, ‰	0,20 ±0,05	0,58 ±0,09	0,98 ±0,12
С неклассифицированными аномалиями, ‰	0,85 ±0,12	2,87 ±0,21	3,49 ±0,24

Питательная несбалансированность кормов включена в группу алиментарных неблагоприятных факторов, способных оказывать негативное воздействие на развитие индеек [10]. Их значение в 3-ю фазу онтогенеза индеек (с 5 по 8 недели) очень велико для развития птиц и, следовательно, для сохранения стабильности их генома. Количество витаминов в рационе исследованных птиц отразилось на цитогенетических параметрах следующим образом.

Частоты нормальных эритроцитов. Нормальные эритроциты имеют овальную форму с расположенным в центре овальным же ядром (рис.1, А) и без хроматиновых образований в цитоплазме. Средняя частота нормальных эритроцитов у индеек первой группы, получавших полную дозу витаминов, составила 99,44%, незначительно варьируя у отдельных птиц от 99,19 до 99,62% (табл. 1 и 3). Индейки второй группы, получавшие половинную дозу поливитаминной добавки, имели несколько меньшую среднюю частоту нормальных эритроцитов, равную 98,81% и варьирующую у отдельных особей от 98,48 до 99,09% (табл. 2).

Отсутствие в рационе птиц витаминной добавки сказалось на дальнейшем падении частоты нормальных эритроцитов. Средняя частота нормальных эритроцитов у птиц этой группы оказалась равной 98,51% с размахом изменчивости у отдельных птиц от 97,81 до 98,81% (табл. 3).

Частоты нормальных эритроцитов во второй группе птиц (получавших половинную дозу витаминов) и в третьей группе (не получавших витаминов) статистически достоверно отличаются от частоты нормальных эритроцитов у птиц первой (контрольной) группы при $P \leq 0{,}001$.

Частоты эритроцитов с микроядрами. Если кроме основного ядра в цитоплазме эритроцита обнаруживали дополнительную хроматиновое образование, то его учитывали как микроядро (см. рис.1, Б) Обычно микроядром считают хроматиновые тела, размер которых составляет от 1/10 до 1/3 диаметра основного ядра, лежащих в одной фокальной плоскости с основным ядром, имеющих тот же самый цвет, структуру и преломление света, как и главное ядро, и чётко отделённых от основного ядра слоем цитоплазмы. Индивидуальные частоты микроядерных эритроцитов у отдельных особей контрольной группы варьировали от 0,62 до 1,09‰. Средняя частота эритроцитов с микроядрами у семи индюков из этой группы, получавшей полную дозу витаминов, была равной 0,85‰. У птиц, получавших половинную дозу витаминов, средняя частота микроядерных эритроцитов была несколько выше, чем в контрольной группе и составляла 1,11‰. Различия были статистически не достоверны. Индивидуальные частоты эритроцитов с микроядрами варьировали от 0,79 до 1,60‰. В 3-ей группе птиц, не получавших витаминной добавки, средняя частота эритроцитов с микроядрами была самой высокой – 1,13‰ при варьировании частот у отдельных особей от 0,32 до 1,47‰. Таким образом, полное исключение витаминной добавки из рациона птиц привело к росту средней частоты микроядерных эритроцитов до значений, статистически достоверно отличающихся от частоты микроядерных эритроцитов в первой (контрольной) группе птиц при $P \leq 0{,}05$. Это может свидетельствовать о нарушении гомеостатических и репарационных процессов в организме птиц, не получавших витаминов.

В единственной обнаруженной нами публикации, содержащей сведения о спонтанных частотах возникновения микроядер у индеек, указана величина, установленная по мазкам крови трёх птиц, была равна 0,22‰ [3]. В нашем случае у здоровых индеек частота микроядер была в 4 раза выше. Из-за отсутствия других опубликованных данных о частотах микроядер в эритроцитах индеек объяснить это различие в результатах пока не представляется возможным. Однако размах изменчивости частот микроядер можно проанализировать на примере значительно более детально изученного вида птиц – курицы домашней (*Gallus domesticus*).

В одной из первых публикаций, касающихся вопроса микроядер в эритроцитах у кур [6], микроядерные эритроциты не были обнаружены вообще (частота микроядер = 0). Частота всех других ядерных аномалий была равна 1,14±0,11‰. Средняя спонтанная частота микроядерных эритроцитов у 5 проанализированных кур, выращенных в сельской местности Саудовской Аравии и вскормленных натуральными кормами, составила 0,34‰. Индивидуальные частоты клеток с микроядрами у отдельных особей варьировали от 0,1 до 0,8‰ т.е. различия были восьмикратными [11]. При исследовании влияния иммуностимуляторов маннана и β-глюкана (mannan и β-glucan) на цыплят в контрольной интактной выборке средняя спонтанная частота образования микроядер оказалась равной 1,47±0,31% (процента) [12]. Спонтанная частота микроядерных эритроцитов, обнаруженная у 38-суточных петушков кросса Хаббард Ф-15 была ещё более высокой и составила 4% (процента). Добавление в период с 11 по 38 сутки к основному рациону петушков 1,5, 2,0 и 2,5% фитоминералосорбента приводило к снижению частоты микроядерных эритроцитов до, соответственно, 3,0, 2,5 и 1,8% [13]. Таким образом, частота микроядер в эритроцитах периферической крови курицы домашней варьирует от нуля (или 0,02‰, если учитывать те случаи, когда микроядра всё-таки были обнаружены) до 4%. Столь значительные различия между спонтанными частотами микроядер в периферической крови организмов одного и того же вида достаточно необычны. Причинами таких больших отличий в частотах могут быть не только индивидуальные особенности птиц, но и возможные различия у разных исследователей критериев выявления ядерных аномалий. В обоих случаях целесообразны дальнейшие исследования этого явления и, что не менее важно – стандартизация протокола учёта анализируемых аномалий.

Частоты эритроцитов с почкующимися ядрами. Ядра с пузыревидными выпячиваниями кариоплазмы (рис.1, В) названы почкующимися. Размер такой «почки» может достигать 1/3 от общего объёма ядра. Предполагают, что образование почкующихся ядер связано с амплификацией определённой части генома [6].

Частота эритроцитов с почкующимися ядрами в первой группе птиц (получавших полную дозу витаминной добавки) была равной 0,77‰. При рационе кормления с половинной дозой витаминов наблюдали рост частоты почкующихся микроядер до 1,08‰. Отсутствие в рационе витаминной добавки приводило к ещё большему росту частоты таких аномалий – до 1,66‰.

Частоты эритроцитов с двулопастным ядром – ядром с перетяжкой, делящей его на две приблизительно равные доли; ширина ядра в области перетяжки 1/3-1/2 малого диаметра ядра (рис.1, Г). Двулопастные ядра, возможно, представляют собой ранние этапы аномального амитотического деления эритроцитов. Этот процесс должен будет приводить к неправильному распределению хромосом по дочерним клеткам. Средняя частота двулопастных ядер в эритроцитах индюшат, получавших полную дозу витаминной добавки, была равна 0,12‰. Уменьшение дозы витаминов вдвое повышало среднюю частоту образования таких структур в периферической крови индюков до 0,58‰. У группе птиц, не получавших витаминов, частота двулопастных ядер возрастала до 0,90‰.

Частоты эритроцитов с выемкой в ядре. Такое ядро имеет чётко видимую выемку (зазубрину) глубиной от 1/5 до 1/2 длины большого диаметра ядра, края которой не соприкасаются (рис.1, Д). Ядра с выемкой оказались самым распространённым морфологическим отклонением. Их частота у птиц первой группы (полная доза витаминов в рационе) составила 2,86‰, во второй группе (половинная доза витаминов в рационе) – 5,81‰ и в третьей группе (без витаминной добавки в рационе) – 6,76‰. В некоторых эритроцитах просматривалась вторая выемка с противоположного конца ядра, создавая впечатление процесса расщепления ядра по длинной его оси на две приблизительно равные доли. Однако ни в одном из таких эритроцитов никаких признаков его подготовки к цитокинезу не наблюдали.

Частоты эритроцитов с хвостатыми ядрами. Хвостатыми были названы ядра, один край которых резко сужен и вытянут. Длина «хвоста» может быть до 1/3 большого диаметра ядра (рис.1, Е). Ряд исследователей высказали предположение, что хвостатые ядра являются следствием разрыва кариоплазматических мостиков в клетке, при образовании в ней дицентрической хромосомы, центромеры которой растягиваются нитями веретена деления к разным полюсам. В результате разрыва такой хромосомы ядерная оболочка, сформированная вокруг двух дочерних ядер образует у каждого ядра клювообразный вырост или «ядерный хвост» (рис. 1, Е). Частота хвостатых ядер в эритроцитах индюшат, получавших полную дозу витаминов, была равна 0,20‰. Выращивание птицы на рационе лишь с половинной дозой витаминов вызывало увеличение частоты клеток с такими аномалиями до 0,58‰. Полное исключение из рациона поливитаминной добавки приводило к ещё большему росту частоты хвостатых ядер до 0,98‰. Эти данные позволяют сделать заключение о том, что недостаток в рационе птиц витаминов групп ***A***, ***D_3*** и ***E*** может приводить к увеличению частоты дицентрических хромосом.

Частоты эритроцитов с недифференцированными аномалиями ядер. Помимо указанных выше ядерных аномалий в эритроцитах были обнаружены и другие типы нарушений морфологии ядра (рис. 2), которые не могли быть отнесены ни к одному из ти-

пов аномалий, предложенных в работе [6] для анализа нестабильности генома у птиц. Их классификация должна быть предметом специального исследования. В нашей работе такие нарушения были отнесены в одну группу – «недифференцированных» или «неопределённых» аномалий.

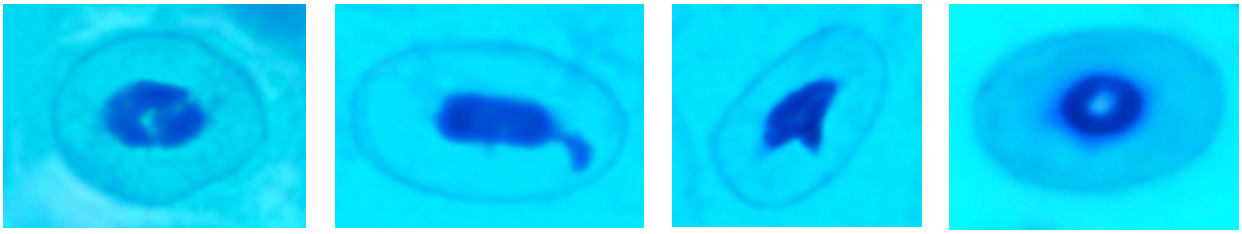


Рис. 2. Различные не дифференцируемые аномалии ядер в эритроцитах индеек

Суммарная (средняя) частота всех недифференцированных ядерных аномалий в группе птиц, получавших полную дозу витаминов, была равна 0,85‰. У индюков, получавших половинную дозу витаминов, частота таких аномалий возрастала до 2,87‰. Периферическая кровь индюков, не получавших витаминов, содержала 3,49% эритроцитов с недифференцированными аномалиями ядер.

Суммарные частоты всех ядерных аномалий. Средние частоты эритроцитов с ядерными аномалиями всех шести типов в первой, второй и третьей группах птиц были равны 0,56, 1,19 и 1,49% соответственно. Последние две величины статистически достоверно отличались от первой (контрольной). Таким образом, уменьшение дозы витаминов вполовину и полное изъятие витаминной добавки из рациона птиц приводило к статистически достоверному росту суммарных частот эритроцитов с аномалиями. Средние частоты всех ядерных аномалий (включая эритроциты с микроядрами) у птиц первой второй и третьей групп составили 0,56, 1,19 и 1,49%, соответственно.

Эмбриональное развитие птиц и следующий за ним постнатальный онтогенез происходят под контролем генотипа. Во время развития птицы в процессе реализации наследственной информации происходит формирование видовых и индивидуальных биохимических, физиологических и морфологических свойств организма, формирующих хозяйственно ценные признаки птицы. Большая часть этих признаков имеют полигенную природу, поэтому их формирование происходит в результате сложного взаимодействия многих генов и биохимических процессов, детерминируемых работой этих генов. Устойчивое функционирование генотипа в большой мере зависит от внешних условий, в которых происходит развитие организма. Эти средовые факторы, внешние относительно генотипа, могут существенно влиять на реализацию генетической информации, ослабляя или усиливая её реализацию. Для осуществления этой сложной регуляции биохимических процессов геном птицы должен обладать определённой степенью стабильности, осуществляемой гомеостатическими механизмами на биохимическом уровне и процессами репарации наследственного материала на генетическом уровне.

Биохимический состав кормов является одним из внешних факторов, способных влиять и на стабильность генома птиц, и на характер реализации генетической программы в процессе откорма птиц. Не касаясь вопросов мутагенности различных химических веществ, не предназначенных для кормления птицы, но иногда загрязняющих корма в результате различных событий и процессов, остановимся лишь на объекте нашего исследования – роли витаминов в нормальном функционировании генома.

Витамины представляют собой органические биологически активные соединения различной химической природы, выполняющие функции биокатализаторов либо самостоятельно, либо в составе других ферментов. Витамин А нужен для дифференцировки тканей у эмбрионов и нормального развития птенцов. Недостаток этого витамина у взрослых птиц приводит к нарушению зрения, снижению прироста живой массы, прекращению яйцекладок. Витамин D регулирует фосфорно-кальциевый обмен. Он способствует нормальному образованию костной ткани и скорлупы яиц. Недостаток витамина D приводит к нарушению минерального обмена, развитию рахита, у взрослых птиц снижается яйценоскость, в отложенных яйцах снижается качество скорлупы. Витамин Е способствует усвоению других жирорастворимых витаминов, обеспечивает нормальную функцию нервной и репродуктивной систем, активизирует пролиферацию клеток. При недостатке витамина Е могут развиваться мышечная дистрофия, некроз клеток, атаксия, паралич, бесплодие, угасание сперматогенеза, задержка развития и гибель эмбрионов.

В 1949-1952 гг. А. Новиком и Л. Сцилардом было открыто и описано явление антимутагенеза. Вещества, предотвращающие или ослабляющие действие мутагенного фактора, получили название антимутагенов. К настоящему времени антимутагенные свойства обнаружены у более чем 300 соединений, как природного происхождения, так и синтезированных химическим путём. В зависимости от химической природы исследователи разделяют эти антимутагены на несколько групп. Одну из этих групп представляют витамины. Каротиноиды (провитамины витамина ***A***), витамины ***C***, ***E***, ***B₄***, ***K***, обладая антимутагенным действием, обеспечивают стабильность генома [14-17]. Однако помимо антимутагенных свойств витамины при определённых условиях могут проявлять комутагенные и даже мутагенные свойства. Комутагенное действие обнаружено у витаминов С, B_2 и Е. Принимая во внимание неоднозначное значение витаминов для сохранения стабильности генома, следует предположить, что дальнейшее расширение круга исследований роли витаминов в процессах мутагенеза и антимутагенеза необходимо.

Заключение

Производство мяса индейки является одним из наиболее перспективных направлений в российском птицеводстве [18]. В условиях интенсивных технологий выращивания сельскохозяйственных птиц важным фактором достижения высокой продуктивности должно быть биологически полноценное кормление. Научно обоснованные рационы кормления сельскохозяйственной птицы являются результатом многолетних исследований учёных, и попытки их сокращения должны быть изучены до внедрения в производственную практику. В нашем исследовании показано, что уменьшение дозы витаминов в рационе птиц приводит к росту частоты микроядер и иных ядерных аномалий в эритроцитах периферической крови индюков. Это свидетельствует о росте частот аберраций хромосом в клетках кроветворных тканей. Надо полагать, что подобные нарушения происходят и в других тканях птиц, в том числе и генеративных. В этом случае недостаток витаминов в рационе птиц может приводить к снижению жизнеспособности следующих поколений птиц из-за унаследованных хромосомных нарушений.

Основываясь на полученных результатах, следует заключить, что сокращение в рационе индеек количества витаминных добавок с целью снижения себестоимости их откорма является нерациональным.

При анализе публикаций о частотах микроядер в клетках крови у индеек была обнаружена лишь одна работа [3], где сообщены результаты анализа микроядер у 3 мексиканских особей. Отечественных публикаций по этой теме не обнаружено. Возможно, публикуемые нами данные являются первой характеристикой спонтанных и индуцированных гиповитаминозом частот ядерных аномалий в эритроцитах индеек, выращиваемых в России.

Выводы

1) Спонтанная частота образования микроядер в эритроцитах индеек, получавших с полным рационом витаминную добавку «Алфавит АД$_3$Е», была равной 0,88‰. Спонтанная частота всех выявленных ядерных аномалий в сумме составила 0,56%.

2) Двукратное уменьшение в рационе индюков дозы витаминной добавки «Алфавит АД$_3$Е» приводило к увеличению частоты образования микроядер до 1,01‰. Суммарная частота всех ядерных аномалий увеличивалась до 1,01%.

3) Полное исключение из рациона индюков витаминной добавки «Алфавит АД$_3$Е» вызывало увеличение частоты микроядерных эритроцитов до 1,13‰. Суммарная частота ядерных аномалий возрастала до 1,49%.

4) Уменьшение дозы витаминной добавки «Алфавит AD$_3$E» в рационе индеек и, тем более, полное её исключение из рациона не целесообразно, даже с учётом экономии птицефабрикой средств, предполагаемых при сокращении объёма закупок витаминного препарата.

Литература

1. **Производство и рынок** индейки в России // Информационно-Аналитическое Агенство «ИМИТ». Сообщение от 30.01.2019. http://emeat.ru/new.php?id=114353 (дата обращения 19.07.2019).
2. **Falck G.** Micronuclei in human peripheral lymphocytes – mechanistic origin and use as a biomarker of genotoxic effects in occupational exposure. / People and Work. Research Reports 104. Helsinki: Finnish Institute of Occupational Health. – 2014. – 108 p.
3. **Zúñiga-González G. et al.** Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): part two. / Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Luna-Aguirre J. [et al.] // // Mutation Res. – 2000. –V. 467. – № 1. – P. 99-103.
4. **Калаев В.Н., Красножон К.Б., Игнатова И.В**. Оценка стабильности генома больных сахарным диабетом I типа с использованием микроядерного теста в буккальном эпителии // Фундаментальные исследования. –2012. – №11. – С. 288-295.
5. **Clark P., Boardman W.S., Raidal S.R.** Atlas of Clinical Avian Hematology. West Sussex, United Kingdom. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. – 2009. – VIII+182 p.
6. **Курса М.А.** и др. Цитогенетические параметры нестабильности генома птиц в эколого-генетическом мониторинге / М.А. Курса, Е.С. Афанасьева, С.Р. Рушковский, Р.А. Барчук [и др.] // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. Выпуск 3, часть 2. Киев. – 2005. – С. 92-98.
7. **Урбах В.Ю.** Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина, – 1975. – 295 с.
8. **Adam M.L. et al.** Assessment of Genome Damage in Bird and Mammal Species as a Tool for Improvements in ex-situ Conservation at Zoos / M.L. Adam, R.A. Torres, M. Kiska, F.F. Oliveira // Natureza & Conservação, Brazilian Journal of Nature Conservation. – 2013. – V. – 11. – № 1. – P. 59-64.
9. **Baesse C.Q. et al.** Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments / C.Q. Baesse, V.C. de Magalhães Tolentino, S. Morelli, C. Melo // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2019. – V. 171. – P. 631-637.
10. **Шевченко А.И., Ёлкина Л.Г.** Характер проявления ряда неблагоприятных факторов в различные периоды роста и развития индеек // Птица и птицепродукты. – 2012. – № 1. – С. 49-51.

11. **Saleh K., Sarhan M.A.A.,** 2007. Clastogenic analysis of chicken farms using micronucleus test in peripheral blood // Journal of Applied Sciences Research. –2007. –V. 3. –№ 12. –P. 1646-1649.
12. **El-Seehy, M.A. El-Moghazy G.M., El-Okazy A.M.** Effect of mannan and β-glucan as feed additives on genotoxicity and immunity on broilers // Alexandria Science Exchange Journal. – 2013. – V. 34. – № 2. – P. 164-169.
13. **Яковлева И.Н. и др.** Микроядерный тест генотоксичности и его снижение при добавках к комбикорму птиц фитоминералосорбента / Яковлева И.Н., Мусиенко Н.А., Дронов В.В., и др. // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – Т.214. – С. 506-510.
14. **Дурнев А.Д.** Антимутагенез и антимутагены // Физиология человека. – 2018. – № 3. – С.116-137.
15. **Clycombe K.J., Meydani S.N.** Vitamin E and genome stability // Mutat. Res. Fundament. and Molec. Mech. of Mutagenesis. – 2001. – V. 475. –P. 37-45.
16. **Collins A.R.** Carotenoids and genomic stability // Mutat. Res. Fundam. and Molec. Mech. of Mutagenesis. – 2001. – V. 475. – P. 21-28.
17. **Halliwell B.** Vitamin C and genomic stability // Mutat. Res. Fundament. and Molec. Mech. of Mutagenesis. – 2001. – V. 475. – P. 29-35.
18. **Давлеев А.Д.** Ключевые факторы и тенденции российского рынка индейки в 2014-2020 гг. Части 1 и 2. // Птица и птицепродукты. – 2015. – № 4. – С. 12–15. – № 5. – С. 10-14.

Поступила в редакцию: 10.08.2019 г.

Крюков Владимир Иванович, доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник ИНИИ ЦКП ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», email: ecogenet@mail.ru, тел. 8 (4862) 47-51-71, e-mail: iniic@mail.ru

Власова Евгения Юрьевна, студентка 5 курса ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина», Россия, г. Орёл, тел. 8 (4862) 47 51 71, e-mail: iniic@mail.ru

УДК 636.087.8

Мурленков Н.В., аспирант
Шендаков А.И., д.с.-х.н., профессор
Murlenkov N.V., Post-graduate student
Shendakov A.I., Doctor of Agricultural Sciences, Professor
ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»,
Орел, Россия
Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education
"Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin", Orel, Russia
e-mail: chr98@yandex.ru

ПЕРЕВАРИМОСТИ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ И МОРФО-БИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС ТЕЛЯТ ПРИ СКАРМЛИВАНИИ ПРОБИОТИКОВ

(Digestibility of nutrients and morpho-biochemical status of calves when feeding probiotics)

Основной задачей кормления в молочный период является не только обеспечение оптимального прироста живой массы, но и заселение пищеварительной системы полезной микрофлорой и борьба с патогенной. Существенную помощь по решению данной проблемы предлагают пробиотические препараты. В последнее время все больший интерес вызывают спорообразующие пробиотики. Они выдерживают обработку высокими температурами и не разрушаются пищеварительными соками. Пробиотические препараты, назначаемые с профилактической и лечебной целью, должны быть не только безопасными, но обязательно эффективными, поскольку эти свойства влияют на экономическую составляющую предприятия. Целью исследования являлось определение сравнительной эффективности и безопасности спорогенных пробиотиков «Олин» и «Триолин» при выращивании телят молочного периода в условиях Орловской области. Задачи исследования: 1) установить влияние обозначенных препаратов на морфо-биохимические показатели крови животных; 2) определить поступление и переваримость питательных веществ рациона у телят.

Ключевые слова: молочные телята, пробиотики, показатели крови, переваримость питательных веществ.

The main task of feeding dairy season is not only to ensure the optimal weight gain, but also to the settlement of the digestive system useful microflora and the fight against pathogens. Probiotic offer substantial help in solving this problem. Recently, spore-forming probiotics have been of increasing interest. They can withstand high temperatures and are not destroyed by digestive juices. Probiotic prescribed for prophylactic and therapeutic purposes should not only be safe, but necessarily effective, since these properties affect the economic component of the enterprise. The aim of the study was to determine the comparative effectiveness and safety of the sporinated probiotics “Olin” and “Triolin” in growing dairy calves in the conditions of the Oryol region. Research objectives: 1) establish the effect of the indicated drugs on the morpho-biochemical parameters of the blood of animals; 2) determine the intake and digestibility of nutrients in the diet of calves.

Keywords: dairy calves, probiotics, blood counts, digestibility of nutrients.

Нормально сформированная микрофлора кишечника – обязательное условие жизни и здоровья животных. Во-первых, микрофлора вырабатывает ряд пищеварительных ферментов и витаминов. Во-вторых, она помогает организму усваивать микро- и макроэлементы, в том числе кальций [5]. Микрофлора кишечника играет ключевую роль в переводе питательных веществ из неорганических форм в органические. В-третьих, микрофлора нейтрализует токсины. Например, многие микотоксины ядовиты только для животных и птицы. В-четвертых, микрофлора важна для повышения иммунитета. Около 60-80% всех иммунокомпетентных клеток находится в слизистой желудочно-кишечного тракта. В результате неправильного кормления, болезней, стрессов в кишечнике начинается усиленное развитие болезнетворной микрофлоры (сальмонеллы, стафилококки, клостридии и т.д.) [6], что приводит к новым заболеваниям животных и птицы, снижению их продуктивности, ослаблению иммунитета. Защита слизистой ЖКТ снижает вероятность проникновения в организм животного других инфекций.

С этой целью для телят успешно применяют пре- и пробиотики. Имеются сведения о положительном влиянии спорогенных пробиотиков на организм сельскохозяйственных животных и птицы [1, 3], что обусловлено антагонистическими свойствами Bacillus subtilis по отношению к широкому спектру патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; это оптимизирует микробиоценозы в кишечнике и нормализует обменные процессы в организме животного [4].

В рамках представленного исследования было изучено влияние спорогенных пробиотиков «Олин» и «Триолин» на показатели роста телят черно-пестрой породы в условиях Орловской области.

Материалы и методы исследования

Для проведения эксперимента по принципу аналогов были сформированы три группы телят по 6 го-

лов в каждой. Подопытный молодняк в возрасте соответствовал возрасту (45 дней) и физиологическому состоянию. Контрольная группа получала только основной рацион. Опытные группы вместе с основным рационом в составе ЗЦМ получали пробиотики на протяжении 10 дней: 2 группа – «Олин» в дозировке 7 гр/г в сутки, 3 группа – «Триолин» в той же дозировке – 7 гр/г в сутки. Пробиотики добавляли в ЗЦМ перед утренним кормлением.

С целью оценки влияния применяемых пробиотических препаратов на развитие пищеварительной системы подопытных животных, в трехмесячном возрасте в связи с переводом телят на растительные корма, проводилось исследование рубцовой жидкости и показателей суммарного пищеварения подопытных животных. Для этого на 10 сутки после смены рациона производили забор содержимого рубца, учитывали поедаемость кормов и содержание питательных веществ в них и в кале для определения коэфициентов переваримости. Содержание питательных веществ в потребленных кормах и выделенном кале – методом химического анализа.

По завершению эксперимента был произведен забор крови от каждой группы. Анализы проводились на базе БУОО «Орловского областного ветеринарного центра». Кровь брали из яремной вены до кормления после окончания опыта.

Результаты исследований

Выявление токсичности пробиотиков, а также ответной реакции организма на их восприятие мы определяли в несколько этапов. Первый этап нашего опыта – исследование морфологии крови (табл.1).

Таблица 1 – Морфологические показатели крови телят

Показатели	Норма	Группы		
		1 контрольная	2 опытная	3 опытная
Эритроциты, 10^{12}/л	5-7,7	6,85±0,06	6,86±0,10	6,70±0,22
Гемоглобин, г/л	90-120	112,85±0,71	116,43±0,68**	115,66±1,09*
Цветной показатель, %	0,81 - 1,08	1,010±0,01	1,043±0,01*	1,035±0,004*
СОЭ, мм/ч	0,5 - 1,5	1,13±0,12	0,84±0,11	0,88±0,15
Гематокрит, л/л	0,35-0,45	0,40±0,01	0,42±0,007	0,42±0,01

Примечание: * - P<0,05, ** – P<0,01.

По данным таблицы, установлено, что наибольшее число эритроцитов содержалось в крови телят 2 опытной группы – 6,86 10^{12}/л. Содержание гемоглобина во 2 и в 3 группах ровнялось 112,85 г/л и 115,66 г/л, что соответственно на 3% (P<0,01) и 2,5% (P<0,05) больше показателя контрольной группы. Также мы установили, что насыщение эритроцитов гемоглобином в контрольной и опытных группах происходило в нормативном диапазоне от 1,010 до 1,043%. Процент цветного показателя во 2 и в 3 группах составил 1,043%, что на 3% (P<0,05) и 2,4% (P<0,05) выше контрольной соответственно. Наибольший показатель скорости оседания эритроцитов был выявлен в контрольной группе – 1,13%, однако сохранялся в пределах нормы. Уровень гематокрита в опытных группах составил 0,42 л/л, что соответственно на 5% больше показателя контрольной.

Второй этап нашего опыта – исследование биохимии крови – позволяет оценить работу внутренних органов, получить информацию о метаболизме и выяснить потребность в микроэлементах [2] (табл. 2).

Таблица 2 – Биохимические показатели крови телят

Показатель	Норма	Группа		
		1 контрольная	2 опытная	3 опытная
Глюкоза, ммоль/л	2,2-3,88	3,00±0,04	3,68±0,30*	3,28±0,14*
Холестерин, ммоль/л	1,4-4,42	3,76±0,21	4,06±0,20	3,35±0,14
Кальций, ммоль/л	2,5 – 3,13	2,47±0,21	2,96±0,11*	2,83±0,12
Фосфор, ммоль/л	1,45 – 1,94	1,63±0,13	1,71±0,11	1,70±0,08
Общий белок, г/л	55-71	66,89±1,06	67,84± 0,48	68,79±0,55
Альбумины, %	28-35,6	33,47±0,41	33,68±0,40	33,67±0,26
Глобулины, % фракции:				
α-глобулины	12-20	16,89±0,90	16,19±0,31	17,30±0,17
β-глобулины	10-17	15,05±0,28	16,33±0,32*	15,61±0,27
γ-глобулины	25-40	33,44±0,18	35,01±0,95*	33,56±0,20

Примечание: * - P<0,05.

Показатель уровня глюкозы во 2 и в 3 группах составил 3,68 ммоль/л и 3,28 ммоль/л соответственно, который превосходил показатели контрольной на 22,6% (P<0,05) и 9,3% (P<0,05). Наиболее высокий показатель холестерина был зафиксирован во 2 группе – 4,06 ммоль/л, который на 8% превосходил контрольную группу. Уровень кальция во 2 группе составил 2,96 ммоль/л, который был выше, чем в контрольной группе, на 20% (P<0,05).

Уровень фосфора во 2 и в 3 опытных группах находился в пределах 1,70-1,71 ммоль/л, что на 5% больше, чем в контроле, соответственно. Соотношение белка в 3 опытной группе составило 68,79 г/л, что 2,9% большем аналогичного показателя контрольной группы. Процент альбуминовой фракции для всех групп был удовлетворительным. Анализ α-глобулинов не выявил отклонений от нормы. Фракция β-глобулинов показала, что в образцах 2 опытной группы данный показатель был наиболее высоким – 16,33%, что на 8,8% (P<0,05) больше, чем в контрольной группе. Во фракции γ-глобулинов образцы 2 опытной группы превосходил контроль на 13,6% (P<0,05).

Молочный период жизни характеризуется глубокими изменениями в строении и функциях организма телят. Для контроля развития рубцового пищеварения в трехмесячном возрасте, в связи с увеличением доли растительных кормов в рационах телят, был проведен анализ рубцовой жидкости (табл. 3).

Таблица 3 – Переваримость питательных веществ рациона у телят

Показатели	Группа		
	контрольная	1 опытная	2 опытная
Сухого вещества			
Принято, г	2991,7	3072,5	3080,4
Выделено с калом, г	897,5	826,7	829,8
Переварено, г	2094,2	2245,8	2250,6
Коэф. переваримости,%	70,0±0,79	73,1±0,40*	73,1±0,74*
Сырого протеина			
Принято, г	461,7	472,4	469,8
Выделено с калом, г	143,1	132,3	130,1
Переварено, г	318,6	340,1	339,7
Коэф. переваримости,%	69,0±0,68	72,0±0,78*	72,3±0,55*
Сырого жира			
Принято, г	271,3	273,5	276,2
Выделено с калом, г	57	52	53
Переварено, г	214,3	221,5	223,2
Коэф. переваримости,%	7,9±0,60	8,1±0,36*	8,1±0,23*
Сырой клетчатки			
Принято, г	555,1	580,1	582,8
Выделено с калом, г	344,2	348,8	350,6
Переваримость, г	210,9	231,3	232,2
Коэф. переваримости,%	38,0±0,57	39,9±0,32*	39,8±0,33*

Примечание: * - P<0,05.

Все коэффициенты переваримости опытных групп оказались достоверно выше контроля. Коэффициенты переваримости сухого вещества в опытных группах были выше, чем в контроле, на 3%; сырого протеина – на 3%, сырого жира – на 2%, сырой клетчатки – на 2%. Анализ таблиц показал, что включение пробиотика в опытные группы способствовало наилучшему перевариванию питательных веществ.

Выводы.

Рассматривая результаты морфо-биохимических анализов крови телят, можно сделать вывод, что препараты «Олин» и «Триолин» не оказали отрицательного воздействия на исследуемые показатели. Пробиотик «Олин» наибольшее влияние оказал на повышение показателей: гемоглобина – 3% (P<0,01); глюкозы – 22,6% (P<0,05); кальция – 20 (P<0,05); фракции β-глобулинов и γ-глобулинов – 8,8% и 13,6% соответственно. Кроме того, включение пробиотиков способствовало наилучшему перевариванию питательных веществ животных. Однако данные, полученные от 1 опытной группы (включение пробиотика «Олин»), превосходили результаты контрольной и 2 опытной группы. Поэтому представляется возможным рекомендовать производству использование спорообразующего пробиотика «Олин» в дозировке 7 г/г в сутки в течение 20 дней для телят в 1,5 месячном возрасте.

Литература

1. **Вагапов Ф.Ф.** Влияние препарата Ветоспорин Ж на потребление и переваримость питательных веществ рационов бычков // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2017. № 6 (68). С. 154-157.
2. **Ерёменко В.И., Морозов К.Г.** Содержание общего белка и иммуноглобулинов в крови телят при скармливании им пробиотиков // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2016. № 8. С. 64-66.
3. **Маркин Ю., Нестеров Н.** Разумная альтернатива антибиотикам пробиотики в рационах для птицы // Животноводство России. 2018. № 2. С. 8-11.
4. **Миколайчик И.Н., Морозова Л.А., Ступина Е.С.** Переваримость питательных веществ и обмен азота в организме телят при скармливании дрожжевых пробиотических добавок // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. 2017. № 9. С. 20-25.
5. **Мошкина С.В.** Научное обоснование системы кормления молочного скота // Научные исследования - сельскохозяйственному производству: материалы международной научно-практической конференции, Орел. 2018. С. 167-170.
6. **Пак И.В., Бетляева Ф.Х., Трофимов О.В.** Влияние пробиотика Субтилис на неспецифическую резистентность у телят // Зоотехния. 2018. № 3. С. 4-8.

Поступила в редакцию: 20.08.2019 г.

Мурленков Никита Вячеславович, аспирант кафедры частной зоотехнии и разведения сельскохозяйственных животных, ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н. В. Парахина», e-mail: chr98@yandex.ru

Murlenkov Nikita Vyacheslavovich, post-graduate student of the Department of zooingering and animals breeding , Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education "Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin". e-mail: chr98@yandex.ru

Шендаков Андрей Игоревич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н. В. Парахина», aish78@yandex.ru, тел. 8-953-816-78-84,

Shendakov Andrey Igorevich, Doctor of Agricultural Sciences, Professor FSBEE HE "Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin", aish78@yandex.ru, tel. 8-953-816-78-84.

УДК 636.082

Глазкова Н.Ю., аспирант
Glazkova N.YU., Post-graduate student
ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»,
Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education
"Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin", Orel, Russia
e-mail: glazkova_nataliya@bk.ru

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ У КОРОВ ЧЁРНО-ПЁСТРОЙ ПОРОДЫ ФГУП «СТРЕЛЕЦКОЕ» ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

(Immunogenetic polymorphism in cows of Black-and-White breed from FSUE «Streletskiy» in Orel region)

Особую актуальность в селекционной работе приобретает применение групп крови в качестве сигнальных маркеров для изучения наследственных особенностей и потенциальных возможностей скота. Для отражения селекционных процессов, происходящих в породе и стаде, необходимо изучение иммуногенетического полиморфизма. В связи с этим в работе изучены аллели групп крови по 11 системам локусов, а также динамика их встречаемости. В результате данного исследования по стаду ФГУП «Стрелецкое» прослеживается, что 50% скота являлись носителями желательных аллелей $A_1, G_2, Y_2, O_4, Q', E'_1, C_1, W, X_2, H', FF, V$ которые могут быть генетическими маркерами молочной продуктивности коров.

Ключевые слова: иммуногенетика, иммуногенетический полиморфизм, чёрно-пёстрая порода, генетические маркеры, динамика встречаемости, аллели, группы крови.

Of particular relevance in the breeding work is the use of blood groups as signal markers for the study of hereditary characteristics and potential capabilities of livestock. To reflect the selection processes occurring in the breed and herd, it is necessary to study immunogenetic polymorphism. In this regard, the study studied alleles of blood groups in 11 locus systems, as well as the dynamics of their occurrence. The result of this study, the herd FGUP "Streletskaya", is that 50% of cattle were carriers of desirable $A_1, G_2, Y_2, O_4, Q', E'_1, C_1, W, X_2, H', FF, V$ alleles that may be genetic markers of milk productivity of cows.

Keywords: immunogenetics, immunogenetic polymorphism, Black-and-White breed, genetic markers, dynamics of occurrence, alleles, blood groups.

Введение. Иммуногенетика изучает особенности групп крови животных и разрабатывает методы их использования в качестве генетических маркеров в селекции, генетический контроль иммунного ответа, генетику несовместимости тканей при пересадках, закономерности наследования антигенной специфичности, проблему поддержания генетического гомеостаза многомиллионной популяции соматических клеток организма и др. [1]

Одним из направлений использования иммуногенетических данных в селекции является изучение генетической структуры селекционируемых популяций по маркерным генам, основой чему служит анализ распределения маркеров (антигенов и аллелей групп крови) в стаде. Генетические факторы имеют особое значение при создании новых пород, способствуя формированию их генеалогической структуры [2].

Генетические маркеры позволяют получать информацию о разных состояниях генов (аллельных вариантах) и непосредственно экспериментально исследовать, какие варианты отдельных генов и генных ансамблей имеют преимущественное распространение у групп организмов, несущих желательный комплекс признаков в конкретных средовых условиях. Использование большого количества генетических маркеров в качестве критериев селекционных процессов позволяет более достоверно оценивать генетический потенциал пород, популяций и отдельно взятых особей, более точно контролировать селекционные процессы в стадах, корректировать их направленность [4].

Изучение маркеров особенно важно в отношении признаков, проявляющихся на поздней стадии жизни, ограниченных полом, подверженных большому воздействию среды (удой, плодовитость, устойчивость к заболеваниям).

Периодическая оценка генофонда популяций по полиморфным системам групп крови, определение гомозиготности, использование маркерных аллелей позволяет надёжно управлять селекционным процессом [5].

Такая работа позволяет целенаправленно обновить стадо того или иного хозяйства, создать определенный тип животного исходя из потребностей рынка, а также совершенствование технологических процессов [4].

В связи с этим **целью исследований** являлось изучение иммуногенетического полиморфизма чёрно-пёстрой породы коров на предприятии ФГУП «Стрелецкое». Исходя из цели исследова-

ний, были сформулированы следующие задачи: 1) расчёт встречаемости аллелей чёрно-пёстрой породы; 2) определение потенциальной маркерной способности аллелей групп крови;

Материалы и методы исследований

Изучение иммуногенетического полиморфизма проводилось у коров чёрно-пёстрой породы в хозяйстве ФГУП «Стрелецкое» (соответственно 96 голов). Определение эритроцитарных аллелей ФГУП «Стрелецкое» проходило в лаборатории генетики сельскохозяйственных животных Всероссийского института животноводства имени Л.К. Эрнста. Также нами были изучены и проанализированы племенные свидетельства коров изучаемой породы с группами крови по 11 локусам, достоверность происхождения племенного скота хозяйства составляла 100 %.

Результаты исследований и их обсуждение

Исследования показали (рис.1), что у коров чёрно-пёстрой породы на предприятии ФГУП «Стрелецкое» наблюдалась высокая встречаемость следующих аллелей в системах: **EAA**: A1 = 0,4896 (48,96%); **EAB**: G2 = 0,6354 (63,54%), O4 = 0,3646 (36,46%), Y2 = 0,6354 (63,54%), E’1 = 0,4375 (43,75%), Q' = 0,6354 (63,54%), I" = 0,4063 (40,63%); **EAC**: C1 = 0,4167 (41,67%), W = 0,375 (37,5%), X2 = 0,6458 (64,58%); **EAS**: H’ = 0,6979 (69,79%); **EAF-V**: FF = 0,8438 (84,38%), V= 0,2396 (23,96%).

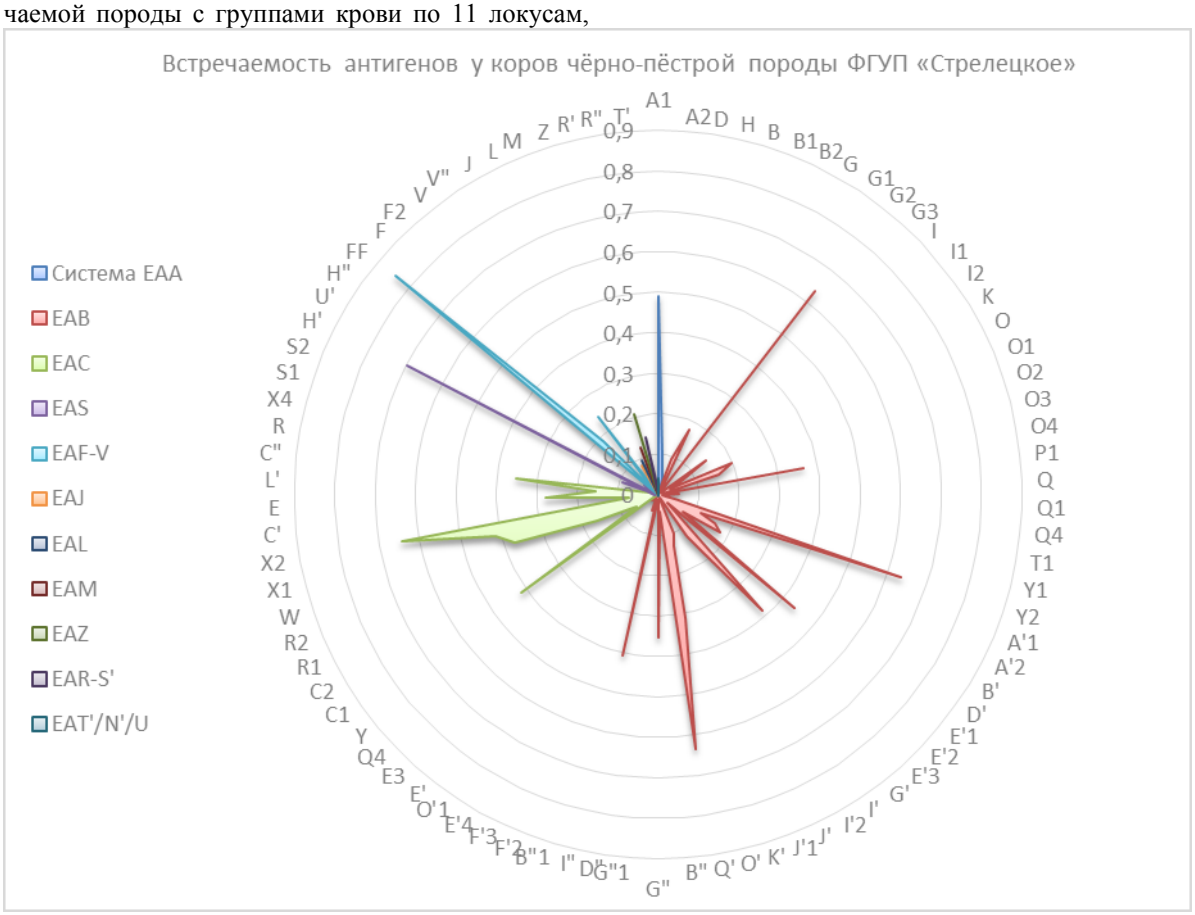


Рис. 1 – Встречаемость антигенов чёрно-пёстрой породы коров в ФГУП «Стрелецкое»

Приведённый рисунок 1 был сделан по принципу рисунков из докторской диссертации А.И. Шендакова [6], но с результатами, получившимися при расчёте динамики встречаемости на предприятие ФГУП «Стрелецкое».

При вычислении также встречалась редкая незначительная концентрация аллелей характерная для следующих аллелей в системах: **EAB** (в этой системе проявлялось большое количество аллелей с редкой концентрацией): G1 =0,0104 (1,04%);G3 = 0,0104 (1,04%); I = 0,0104 (1,04%); I1 = 0,0104 (1,04%); O3 = 0,0104 (1,04%); P1 = 0,0104 (1,04%); Q1 = 0,0104 (1,04%); Q4 = 0,0104 (1,04%); I’2 = 0,0104 (1,04%); J’ = 0,0104 (1,04%); G”1= 0,0104 (1,04%); E’4 = 0,0104 (1,04%); **EAC**: X4 = 0,0104 (1,04%); **EAS:** U’ = 0,0104 (1,04%); **EAF-V:** F2 = 0,0104 (1,04%).

Существует необходимость в выявлении и использовании в селекции генов, которые можно использовать в качестве маркеров молочной продуктивности. Использование ДНК-маркеров позволит расширить возможности селекционной работы и выявит закономерности проявления признака у животного, независимо от внешних факторов. Это поспособствует надёжной идентификации животных и быстрому наращиванию предпочтительных аллелей с целью повышения продуктив-

ности и устойчивости к заболеваниям улучшаемых пород животных.

Расчёты могут подтвердить наши данные, приводимые ранее в опубликованных статьях [3, 7, 8].

Выводы. В результате полученных данных по исследуемому хозяйству ФГУП «Стрелецкое» прослеживается, что 50% скота являлись носителями желательных для отбора и подбора аллелей $A_1, G_2, Y_2, O_4, Q', E'_1, C_1, W, X_2, H', FF, V$ которые могут быть генетическими маркерами молочной продуктивности коров. Таким образом, по нашему мнению, анализ иммуногенетического полиморфизма этих антигенов позволит своевременно корректировать селекционную работу в направлении повышения молочной продуктивности и избегать потери ценных вариантов генов.

Литература

1. **Бакай А.В.** Генетика / А.В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко [Электронный ресурс]. – М.: КолосС, 2013. – (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений)
2. **Букаров, Н.Г.** Современное состояние использования генетических маркеров в племенном скотоводстве [Текст]/ С.Ф. Силкина, Н.Г. Букаров//Сборник научных трудов. Выпуск 5. СНИИЖК. Ставрополь, 2012. -С.41
3. **Глазкова Н.Ю.** Иммуногенетический полиморфизм у голштинских коров ООО «Юпитер» Орловской области// Вестник аграрной науки. – 2019. - №2. – С. 135-138.
4. **Глазкова, Н. Ю.** Иммуногенетический полиморфизм молочного скота на примере ОАО «Орловское» по племенной работе [Электронный ресурс]: выпускная квалификационная работа / Н. Ю. Глазкова. - Электрон. дан. - Орел: Изд-во Орловского ГАУ, 2018.
5. **Фокша В.Ф.** Использование генетических маркеров при оценке быков-производителей / В.Ф. Фокша, А.Г. Константогло// Зоотехническая наука Беларуси – 2004. - № 39. – С. 139-142
6. **Шендаков А.И.** Результаты комплексной оценки биологических параметров в селекции сельскохозяйственных животных // Вестник Орел ГАУ. - 2012. -№6. - С.53-63
7. **Шендаков А.И.** Аллели групп крови с высокой и низкой концентрацией у коров чёрно-пёстрой породы в Орловской области/ А.И. Шендаков, Н.Ю. Глазкова // Вестник аграрной науки. – 2019. – №3. – С. 57-62.
8. **Шендаков А.И.** Иммуногенетический полиморфизм быков-производителей в орловской популяции молочного скота / А.И. Шендаков, Н.Ю. Глазкова, Т.А. Шендакова // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 8. – С. 121-127.
9. **Генетический полиморфизм** белков, групп крови и ДНК лошадей. – [Электронный ресурс]: http://zoovet.info/o-loshadyakh/anatomiya/skhodstvo-loshadej/8573-1-geneticheskij-polimorfizm-belkov-grupp-krovi-i-dnk-loshadej

---

Поступила в редакцию: 20.08.2019 г.

Глазкова Наталия Юрьевна, аспирант кафедры частной зоотехнии и разведения сельскохозяйственных животных, ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», e-mail: glazkova_nataliya@bk.ru

УДК 579.68

Хаффарессас Ясин, аспирант-микробиолог
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
г. Нижний Новгород, Россия
e-mail: yacinechabani@yandex.ru

Haffaressas Yacine, aspirant microbiologist
Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia
e-mail: yacinechabani@yandex.ru

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ, НАСЕЛЯЮЩИХ ПОБЕРЕЖЬЕ АЛЖИРА

(Identification of Cyanobacteria species that populate the Algerian coasts)

Цианобактерии, чьи предковые представители являются источником фотосинтеза кислорода, являются основными участниками эволюции и экологии живых сообществ и играют важную роль в кислородном цикле. Частота и интенсивность цветения цианобактерий увеличилась в последние десятилетия. Это увеличение в основном объясняется воздействием антропогенного влияния, которое привело к усилению эвтрофикации водоемов и созданию благоприятной водной среды для цианобактерий и, в меньшей степени, последствиями изменения климата, способствующими развитию цианобактерий. Четыре основных рода потенциально токсин-продуцирующих цианобактерий образуют цветение в водоемах: Planktothrix, Microcystis, Anabaena и Aphanizomenon. Эти роды имеют свои собственные экологические характеристики и не встречаются в однотипной среде и / или в одно и то же время года.

Ключевые слова: Цианобактерии, Цветение, Токсины, Морские водные среды.

Cyanobacteria, whose ancestral representatives are at the origin of oxygen photosynthesis, are major players in the evolution and ecology of living communities and play a major role in the oxygen cycle. The frequency and intensity of cyanobacterial efflorescence has increased in recent decades. This increase is mainly attributed to the impact of anthropogenic pressures that led to the increasing eutrophication of water bodies and the creation of favorable cyanobacterial aquatic environments and to a lesser extent, the effects of climate change favoring the development of cyanobacteria. Four main genera of potentially toxin-producing cyanobacteria form efflorescence in mid-water bodies: Planktothrix, Microcystis, Anabaena and Aphanizomenon. These genera have ecological characteristics of their own and are not found in the same type of environment and / or at the same time of the year.

Keywords: Cyanobacteria, Efflorescence, Toxins, Marine Aquatic Environments.

Введение. Цианобактерии или цианопрокариоты или сине-зеленые водоросли – это фотосинтезирующие прокариоты, которые по классификации относят к царству эубактерий, а также уже давно их относят к царству растений, поскольку они обладают такими характеристиками:

-бактерии: нет ядра и органеллы;

-водоросли: наличие хлорофилла и фикобилипротеинов (принадлежность пигментов) и способность к фотосинтезу.

Представлены как в морских водных средах, так и средах с пресной водой.

В районах, подверженных сильной эвтрофикации (обогащение питательными веществами из окружающей среды), они способны быстро размножаться и формировать цветение. Кроме того, некоторые виды синтезируют токсины, ответственные за интоксикацию человека и животных, иногда со смертельным исходом. Цианобактерии присутствуют на всех континентах и изучаются такими дисциплинами, как экология, токсикология, таксономия или микробиология.

Цианобактерии размножаются бесполым путем, т.е вегетативным делением.

Есть пять порядков разделения: на двадцать семь семей, которые включают сто шестьдесят шесть родов цианобактерий: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales, Stigonematales.

В Африке эти организмы и их токсины стали предметом нескольких исследований.

Цианобактерии представлены морфологическим разнообразием и функциональной уникальностью в среде водных фотосинтезирующих организмов, которое дает им конкурентное преимущество перед остальными сообществами фитопланктона.

Морфологическая организация этих организмов очень разнообразна: одиночные одноклеточные или колония, многоклеточные нитевидные с оболочкой (так называемые нити) или без (называемые трихомами), с дифференцированием или без дифференцирования клеток.

Эти организмы имеют три различных типа клеток [1]:

-Вегетативные клетки различных форм: круглые, овальные, прямоугольные, квадратные; с

однородным клеточным содержимым или нет; с вакуолями с газом или без.

-Гетероцисты, клетки специализируются на фиксации атмосферного азота, встречаются только у представителей порядка Stigonematales и Nostocales.

-Акинеты, устойчивые клетки, так как имеют толстую стенку и содержат резервы,позволяющие данным порядкам (Nostocales и Stigonematales) выживать в неблагоприятных условиях окружающей среды.

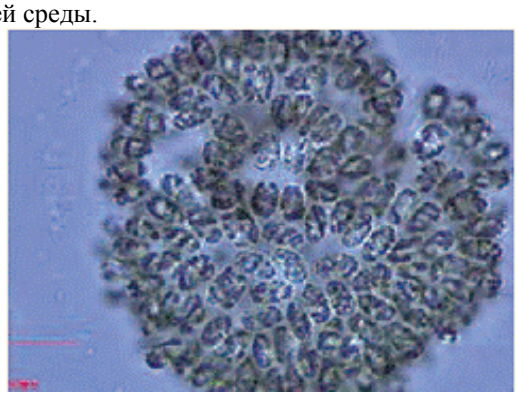


Рис. 1: Колониальный одноклеточные цианобактерии из рода **Woronichinia**

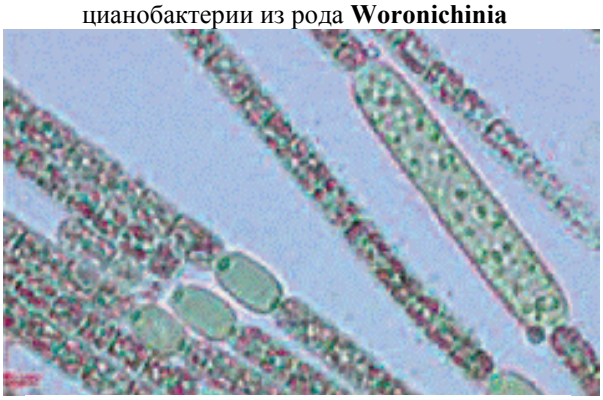


Рис. 2: Цианобактерии, организованные в виде трихом, род **Aphanizomenon**

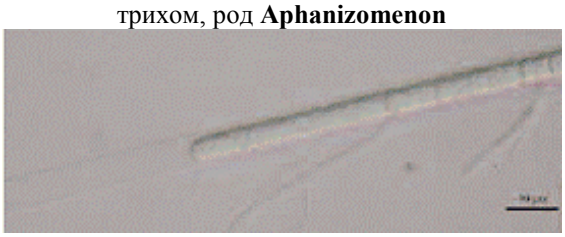


Рис. 3: Цианобактерии, организованные в виде нити, род ***Phormidium***



Рис. 4: трихома цианобактерий (род ***Anabaena***)

Функциональная организация

Цианобактерии лишены ядерной оболочки, митохондрий, эндоплазматической сети и жгутика.

C: карбоксисомы; CPG: гранула цианофицина; T: тилакоиды P: Гранулы полифосфата N: нуклеоплазма; G: Гранулы гликогена; PB: фикобилисома; GV: везикул с газом.

(A) с двойной Тилакоидной мембраной

(B) Клеточная оболочка с внешней мембраной, слоем пептидогликани и плазматической мембраной.

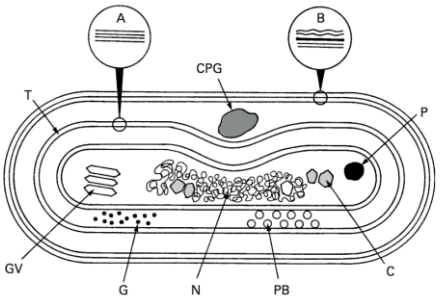


Рис. 5. Схематическое изображение функциональной организации вегетативной клетки цианобактерий [2].

Пигменты.

Реализация кислородного фотосинтеза включает в себя набор фотосинтезирующих пигментов. Термин "пигмент" соответствует тому, что эти молекулы окрашиваются из-за их способности улавливать солнечное излучение. Цианобактерии синтезируют несколько типов пигментов, таких, как хлорофилл и фикобилипротеины или аксессуаров пигментов, таких, как фикоцианин, фикоэритрин и аллофикоцианин. Этот состав пигментов специфичен для цианобактерий и позволяют им использовать солнечную радиацию в большей степени по сравнению с другими водорослями.

Цианобактерии обычно различаются по морфологическим признакам (Размер клетки, наличие оболочки, цвет). Тем не менее, эти функции могут меняться в зависимости от условий окружающей среды, которые могут затруднить идентификацию отдельных видов. В таком случае помочь может наличие или отсутствие гетероцисты (рис. 4), клетки, позволяющей фиксировать атмосферный азот и, придающей цианобактерии способность расти в обедненных азотных средах.

Может наблюдаться другой тип клеток - Акинеты.

Цианобактерии также имеют газовые вакуоли, которые позволяют им корректировать свои позиции в толще воды, регулируя их флотирование.

ЦЕЛИ. Цель диссертации: с использованием методов молекулярной биологии идентифицировать различные виды цианобактерий, населяющих побережье Алжира.

Задачи

1. Анализ литературы по изучаемой проблеме.

2. Сбор материала для исследований.

3. Идентификация типов цианобактерий по анатомическим и морфологическим критериям.

4.Определение количества каждого типа цианобактерий в морской воде.

5. Анализ химического состава морской воды на участках сбора проб цианобактерий.

6. Физико-химический анализ образцов морской воды.

7. Анализ содержания токсинов цианобактерий в бактериальных микросистемах.

8. Молекулярно-генетический анализ выделенных образцов цианобактерий.

9. Создание модели прогнозирования зависимости изобилия и биомассы цианобактерий от условий окружающей среды.

Сбор материала для исследования

Сбор цианобактерий:

Сбор токсичных водорослей выполняется с использованием сети для планктона с размером ячейки 20 мкм, имеющий сборник. Эта операция заключается в фильтраации 50 литров поверхностной воды с использованием сети для планктона, а затем опорожнение сборника (100 мл), содержащего все микроорганизмы диаметром более 20 мкм.

Содержание сборника или коллектора выливают в непрозрачный (затененный) флакон, содержащий 5 мл раствора 13% формальдегида. Это позволяет, во-первых, фиксировать структуры, содержащиеся в фильтрате и, во-вторых, избежать какой-либо бактериальной активности. Затем на флаконе отмечается место и дата сбора.

Идентификация типов цианобактерий

Идентификация типов собранных цианобактерий осуществляется с помощью оптического микроскопа по анатомическим, морфологическим признакам, представляющим собой идентификационные ключи, описанные Bourrelly P. [3].

При этом используются следующие критерии: структура микроводорослей (клеточная или нитчатая), форма (колонии или трихомы), размер и цвет, наличие или отсутствие желатиновой оболочки, акинет, гетероцист, вакуолей газа.

Подсчет определенных цианобактерий:

Подсчет цианобактерий осуществляется после наблюдения в оптический микроскоп (увеличение 10х 40 и 100), удельный объем (0,1 мл) гомогенного образца. Этапы идентификации и подсчета цианобактерий осуществляется соответственно DaPaz и др. [4]: (1) по горизонтальному пути по всей длине ламели; (2) четкий сдвиг высоты ламели примерно на одно поле зрения микроскопа (во избежание дублирования). Эта операция повторяется восемь раз.

Четыре основных типа потенциально-токсичных цианобактерий способных к цветению: Planktothrix, Microcystis, Anabaena и Aphanizomenon [5]. При этом виды Anabaena и Aphanizomenon обычно развиваются в начале лета, и часто заменяются Microcystis в конце сезона. Внутри рода Planktothrix часто встречаются два вида Planktothrix agardhii и Planktothrix rubescens.

Обилие питательных веществ (фосфора и, во вторую очередь, азота) и стабильности водной толщи - факторы, благоприятствующие пролиферации цианобактерий в основном в летний и ранне-осенний период [6].

В работе Souissi М.и др. [7], проходящей в период с июня 2001 года по июнь 2002 года (ОзероУбейра (Oubeira) находящееся на севере Алжира), по наблюдениям описываются морфо-анатомические признаки микроводорослей, по которым в собранном материале удалось выявить наличие 11 типов цианобактерий, из которых 9 признаны потенциально токсичными *: Anabaena*, Microcystis*, Oscillatoria*, Pseudanabaena*, Merismopedia, Aphanizomenon*, Gomphosphaeria*, Cylindrospermum*, Synechocystis*, Lyngbya * и Phormidium.

По итогам исследования выявилось преобладание плотности рода Anabaena. Но наиболее высокая частота возникновения принадлежит роду Microcystis.

Таблица. - Типы потенциально-токсичных цианобактерий, наблюдаемые во Франции и связанные с ними токсины. Токсины, уже выявленные во Франции.

Типы потенциально-токсичных цианобактерий	Токсины
Anabaena **Aphanizomenon** **Coelosphaerium** **Lyngbya** **Microcystis** **Nostoc** **Oscillatoria** **Phormidium** **Planktothrix** **Pseudanabaena** **Rhaphidiopsis** **Synechococcus** **Woronichinia** **Rhaphidiopsis** **Anabaenopsis** **Cylindrospermopsis**	**Anatoxines** Cylindrospermopsines Débromoaplysiatoxine Lyngbyatoxine **Microcystines** Microviridines Saxitoxines

Анализ химического состава морской воды на участках сбора проб цианобактерий

Фосфор и азот необходимы для пролиферации цианобактерий. Это предельные питательные вещества, то есть рост цианобактерий ограничивается наличием фосфора и/или азота. Таким образом, рассматривается соотношение между общим азотом (TN) и общим фосфором (TP). Низкое соотношение TN:TP (от 5 до 29), как правило, способствует развитию цианобактерий [8].

Действительно, цианобактерия имеет большее сродство к фосфору, чем другие водоросли. Кроме того, они способны его накапливать. Что касается азота, цианобактерии могут фиксировать атмосферный азот в своих гетероцистах.

Физико-химический анализ образцов морской воды

Физические параметры:

Эти показатели – инструменты экосистемных изменений, которые могут быть связаны с изменением биомассы водорослей и цианобактерий.

Прозрачность

Пролиферация цианобактерий может снизить прозрачности воды, что является предупреждающим сигналом, в частности, цветения цианобактерий.

Прозрачность толщи воды измеряется с помощью устройства, называемого "диск Секки", который делится на белые и черные области, которые погружают в воду. Прозрачность вычисляется по глубине, на которой более невозможно различить белые и черные области диска. Мы можем говорить о вариации прозрачности, если наблюдается разница в 20 до 30 см между двумя измерениями. Этот метод не нормируется, даже при широком использовании его в лимнологии.

Мутность

Метод определения такого показателя как мутность основан на измерении света, отраженного от частиц, взвешенных в толще воды, и его значение обычно увеличивается в зависимости от числа этих частиц, они могут быть органическими или неорганическими, и состоящими из микроорганизмов, в том числе фитопланктона. Измерение мутности осуществляется с помощью стандартных методик в соответствии с NF ISO 7027 и выражается в NFU (Nephelometric Formazine Unit) из-за сильного поглощения света фитопланктоном результирующий сигнал может быть мал по сравнению с эквивалентной плотностью инертных твердых частиц. Увеличение мутности воды в присутствии цианобактерий может быть ограничено.

Свет

Возможность иметь доступ и использовать имеющийся свет является определяющим фактором в жизнедеятельности цианобактерий. В зависимости от природы света, доступного для фотосинтеза, цианобактерии способны модифицироваться, на уровне транскрипции, экспрессии генов, участвующих в синтезе фикобилисом и определении качественного состава последних [9]. Engelman (1902) описал дополнительный механизм хроматической адаптации. Boresch (1919, 1921) показал, что это изменение цвета соответствовало изменению в соотношении клеток между фикоцианина и фикоэритрина.

Температура

Большинство цианобактерий, способных к цветению, проявляет наибольший рост при температуре 20-25 °C [10]. Тем не менее, оптимальная температура может значительно варьироваться в зависимости от рассматриваемого типа цианобактерий. Таким образом, термофильные виды Synechococcus демонстрируют повышение темпов роста до 35-45 °C [11] и даже способнык к размножению при температурах выше 70°C. Виды, которые могут образовывать цветение в районах с умеренным климатом, различают Oscillatoriale тип Planktothrix agardhii или Planktothrix rubescens, виды, способные представить цветение при низких температурах (<10°C), Nostocale (*Aphanizomenon flosaquae*,*Anabaena flosaquae*, *Anabaena spiroïdes*) и Chroococcale (*Microcystis spp*), требуют более высоких температур (оптимум около 20-25°C) и таким образом формируют события массивных изменений в летний период и в начале осени.

Химические параметры:

Химические параметры связаны, в основном, с метаболизмом фитопланктона, и теми изменениями, которые наблюдаются днем, когда преобладает фотосинтез, и ночью, когда доминирующим является дыхание. На практике ночные измерения могут быть выполнены по утрам, так как период фотосинтеза осуществляется между 12 ч и 18 ч. Эти параметры указывают на наличие пролиферации, но они не являются достаточно чувствительными для определения начала динамики распространения.

Кислород

Кислород производится фотосинтезирующими организмами и является хорошим показателем метаболической активности и количества биомассы.

В течение дня он производится в количествах, достаточных для употребления его для дыхания в течение ночи микроорганизмами, растениями и животными, обитающими в воде.

Таким образом, амплитуда циркадных изменения концентрации кислорода может дать четкую картину наличия и значения пролиферации. Измеренная переменная, либо концентрация кислорода выражается в мг. $л^{-1}$, проценте насыщения кислородом. Растворимость кислорода, в основном, зависит от температуры воды, и должна быть измерена на месте с помощью оксиметра вручную или непрерывно. Значительные ежедневные колебания являются свидетельством увеличения биомассы и, как следствия, увеличения продукции фитопланктона.

pH

В слабо минерализованной воде pH может находиться в пределах от 1 до иногда более 2 еди-

ниц в день, в связи с фотосинтезом и дыханием биомассы.

Информативным показателем наличия пролиферации является амплитуда его циркадных изменений. Она зависит от фотосинтетической активности, буферной способности воды и ее естественного pH. Простое правило предполагает, что вариации считаются значительными в малой буферной среде от 0,5 единиц pH при анализе в этой области. Кроме того, можно контролировать больше параметров, которые связаны с сообществами фотосинтезирующих организмов или цианобактерий.

Дозировка хлорофилла «a»

Количество хлорофилла "a" коррелирует с биомассой живых фотосинтезирующих организмов (водорослей и цианобактерий). Как для других параметров, метод выборки играет очень важную роль для интерпретации и анализа ситуации на месте. Существует два унифицированных метода для определения дозировки хлорофилла "a": спектрофотометрия после экстракции ацетоном до 90 % (Afnor T90-117) и высоко эффективная жидкостная хроматография или HPLC (AfnorT90-116). Спектрофотометрия может быть осуществлена месте при наличии прибора, но анализы по модели HPLC проводятся в лаборатории. Учитывая чувствительность этих методов, их можно использовать для определения цветения цианобактерий на ранних стадиях и отслеживать динамику распространения.

Анализ флуоресценции пигмента

Благодаря различиям, существующим в составе пигмента различных фотосинтезирующих микроорганизмов, можно квалифицировать и подсчитать цианобактерии путем анализа флуоресценции, испускаемой клетками, возбуждаемыми световой стимуляцией. В настоящее время на рынке присутствует два типа погружных зондов на основе этого принципа:

-Первый, размещенный на рынке в 2002 году, помогает различать классы фотосинтезирующих микроорганизмов (chlorophycées, diatomées, cyanobactéries, cryptophycées) путем измерения флуоресценции при эмиссии 680 нм, характерного хлорофилла «a», после возбуждения на определенную длину волны различных типов аксессуаров пигментов [13]. Информация собирается и обрабатывается с помощью программного обеспечения, которое обеспечивает оценку количества (выраженного в µg/l эквивалента хлорофилла «a») из различных классов фотосинтезирующих микроорганизмов.

-Второй, появившийся на рынке в 2004 году, посвящен исследованиям цианобактерий, поскольку он основан исключительно на определении фикоцианина, который является синим пигментом цианобактерий. Его результаты в µg/l фикоцианин. В настоящее время, нет опубликованного исследования, которое предоставляет информацию о преимуществах и недостатках этого инструмента. Эти методы, которые до сих пор не валидизированы и проверяются, являются перспективными, поскольку они могут в конечном итоге позволить преодолеть нынешние трудности в мониторинге цианобактерий.

Анализ содержания токсинов цианобактерий в бактериальных микросистемах

Цианотоксины классифицируются в соответствии с их токсическими эффектами, наблюдаемыми у высших организмов: гепатотоксины, нейротоксины и дерматоксины.

Гепатотоксины включают в себя три основных семейства токсинов: microcystin, nodularin и cylindrospermopsin.

Микроцистины

Микроцистины являются токсинами, наиболее часто встречающимися в окружающей среде (Sivonen и Jones, 1999). Микроцистины - производные цианобактерий, которые включают в себя разнообразие типов, в том числе главных образующих цветение: Microcystis, Planktothrix, Aphanizomenon, Anabaena [14]. На сегодняшний день были определены более 80 типов микроцистинов [15]. Наиболее серьезные случаи отравления у человека, описанные на сегодняшний день, происходили при проведении у больных диализа водой, содержащей Микроцистин, что привело к смерти 60 пациентов. Также считается, что микроцистины вызывают повышенный риск развития рака печени у населения, регулярно потребляющего загрязненную воду [16].

Микроцистин - единственный цианотоксин, для которого ВОЗ было создано токсикологическое опорное значение (1 µgMC-LR /l). Это значение применяется во многих странах как способ регулирования качества воды или в качестве рекомендации.

Наиболее часто наблюдаемым и наиболее токсичным является гепатотоксин микроцистин-LR [17]. На данный момент ни один из методов идентификации токсинов и дозировка токсинов не нормируется, хотя идентификация и определение микроцистинов в настоящее время на пути к стандартизации **ISO**

	метод
CLHP high performance liquid chromatography	Экстракция клеток с помощью 75% жидкого метанола или концентратамикроцистина растворенного на C18
ELISA	Микроцистины растворены или выделены из клеток по методу жидкой экстракции
PP2a proteins phosphatase type 2	Микроцистины растворены или выделены из клеток по методу жидкой экстракции

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование

Выделение ДНК

Выделение rDNA16S осуществляется с помощью Kit Qiagen (Cat. No. 69506) (Приложение 1). Для других штаммов, секретирующих оболочку и слизь извлечение выделение происходит с помощью экстракции фенол-хлороформом и осуществляется в соответствии с протоколом, представленным в Приложении 2.

Амплификация и секвенирование

Амплификация ДНК из каждого штамма проходит в три повтора, в конечном объеме 50 мкл на пробирку, содержащую 2 мкл экстракта ДНК (в концентрации от 10 до 20 нг мкл$^{-1}$) или 8 мкл культуры, 5 мкл буфера "10X ПЦР-буфер» (Fermentas, Канада), 5 мкл $MgCl_2$ 25 мМ,4 мкл 10 мМ ДНТФ Mix, 2 мкл праймеров 10 пмоль / мкл, 1 мкл Taq полимеразы (Fermentas, Канада) и 23 или 29µl из MilliQ воды, ПЦР проводят в четыре этапа:

этап денатурации при 94°C в течение 5 минут

этап из 30 циклов денатурации при 94 ° C в течение 30 сек, лигирования при 57 ° с в течение 30 сек. и удлинения при 72°C в течение 1,5 минут

этап удлинения при 72°C в течение 5 мин

этап прекращения при 10°C в течение 2 мин.

Электрофорез проводят под действием электрического поля 40 мА,180В 30 - 40 минут, для того, чтобы перенести продукты на 1,5% агарозный гель, содержащий бромид этидия (BET). Затем гель фотографируют в УФ-свете, чтобы обозначить миграции. Продукты будут очищены и секвенированы компанией Геном Экспресс (Genome Express) (Meylan, Франция, www.genome-express.com).

Выбор молекулярного маркера и праймеров

Наиболее часто используемым для прокариот маркером является ген рибосомальной 16S. Однако, этот регион является достаточно переменчивым, чтобы достоверно различать многие виды цианобактерий [18].

В литературе описаны первые 700 пар оснований гена 16S, которые соответствуют наиболее переменной части последнего и более информативны, чем другие [19]. Среди праймеров: 27 и 781ab праймер, которые позволяют определять эту область [20]. К тому же, они определяют цианобактерии.

Виды цианобактерий могут быть дифференцированы с помощью гипервариабельном молекулярного маркера [20], например, спейсера (не кодирующего области между двумя генами). Поэтому мы решили использовать спейсер (ITS – «Internal Transcribed Spacer'») между рДНК 16S и 23S, называемый также ITS1 16S- 23S.

Так же праймеры могут амплифицировать эти части генома цианобактерии, в том числе те, которые описаны [20]. После проверки на некоторых штаммах, праймеров 23CITS и 16CITS, разработанных Нейланом и др., (1997), оказалось, что они являются наиболее подходящими и с более высоким уровнем амплификации, чем другие.

Выбор изучаемого вида

Многие штаммы принадлежат к трем потенциально токсичным видам, это Cylindrospermopsis и Anabaena (Nostocales) и род Microcystis (Chroococcales).

Вид Cylindrospermopsi*s* был изучен в предыдущей работе [21], в данном исследовании приоритет был отдан двум оставшимся видам. С практической точки зрения, ITS1 16S-23S из Nostocales делятся на два ампликона, в отличие от Chroococcales, что значительно усложняет анализ. Таким образом, мы выбрали для амплификации 16S-23S ITS1 вида *Microcystis*, для которых доступно большее количество последовательностей в GenBank (137 последовательности против 14 последовательностей для рода Anabaena и ничего для вида Cylindrospermopsis).

Выбор последовательностей, импортированных из GenBank

В GenBank, последовательности рДНК 16S родов и видов, и последовательности ITS1 рода *Microcystis*, найденных для филогенетического анализа.

Создание модели прогнозирования зависимости изобилия и биомассы цианобактерий от условий окружающей среды

Одной из главных ролей экологии как науки является ознакомление общества с экологическими проблемами. Поэтому экология должна стремиться производить средства для описания, понимания и предвидения будущего развития нашей среды (Peters, 1991).

Это происходит в основном за счет создания моделей, обобщающих знания, полученные в различных исследованиях, связанных с функционированием биотических сообществ (физиологии, биогеохимии, географии и т.д.), и с целью помочь предсказать их эволюцию. Эти модели, путем их строительства и проверки, могут, в свою очередь, позволить взглянуть по-новому на подходы к пониманию изученных явлений (рис. 6).

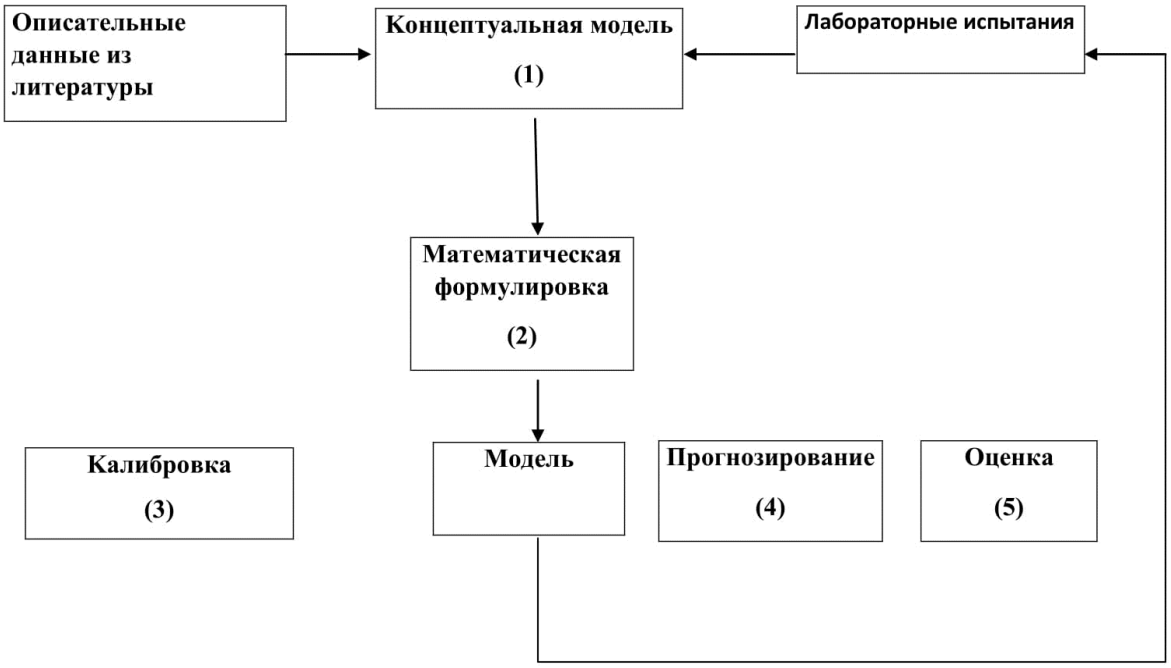


Рис. 6. Этапы производства модели (Этапы 1-5) (Guisan и Zimmermann, 2000)

Заключение

Целью данной работы является предоставление данных о различных видах цианобактерий, населяющих побережье Алжира, с различными морфологическими и трофическими характеристиками с использованием современных методов идентификации молекулярной биологии.

Алжир не застрахован от риска для здоровья населения, связанного с наличием токсичных цианобактерий. Однако многое еще предстоит сделать, с точки зрения общественной информации и проведения эпидемиологических обследований государственных и частных служб здравоохранения. Детерминизм производства токсинов должен быть проверен на большом количестве сайтов, если кто-то хочет иметь возможность проверить их. Также было бы желательно создать модель, которая предназначена для прогнозирования их развития и понимания изучаемого явления, а также для предотвращения любого риска массовой интоксикации.

Литература

1. **Komárek J.** Phenotype diversity of the cyanoprokaryotic genus Cylindrospermopsis (Nostocales)/ Komárek J. [et al.] // Review Czech Phycol. –2002. – Vol.3. – P.1–30.
2. **Stanier R.Y.** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria / Stanier R.Y. [et al.] //A. Rev. Microbiol. –1977. –Vol.31. – P.225-274.
3. **Bourrelly P.** Les algues d'eau douce/ Bourrelly P. //N. Boubée & Cie Paris. – 1985. – Vol.3. – P.606.
4. **Da Paz M.**Phytoplancton des zones mytilicoles de la baie de Vilaine et Intoxication par les coquillages/ Da Paz M. [et al.] //Rev. Trav. Inst. Pêches marit. –1983. –Vol.3. –P. 233-266.
5. **Chorus I.** Toxic Cyanobacteria in Water/ Chorus I. [et al.] // E & F Spon. –1999.
6. **Rapport de l'Afsset et de l'Afssa.** Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives/ Maisons-Alfort. –2006.
7. **SOUISSI M. Les** Cyanobactéries d'un plan d'eau douce (Le Lac OUBEIRA- EL KALA). Inventaire et Répartition Spatiale/ SOUISSI M. [et al.] //Revue Sciences & Technologie C, Université des Frères Mentouri Constantine. – 2004. –N°22. –P.38-42.
8. **Huisman J.** Population dynamics of harmful cyanobacteria/ Huisman J. [et al.] //Springer, Dordrecht. –2005. –P. 143-176.
9. **Kehoe M.D.** Responding to color: The regulation of complementary chromatic adaptation/ Kehoe M.D. [et al.] //Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. –Tom 57. –P. 127-150.
10. **Reynolds C.** Ecology of Phytoplankton/Reynolds C.//Cambridge University Press. –2006.
11. **Kratz W. A.** Nutrition and growth of several bluegreen algae/ Kratz W. A. [et al.] // Amer. J. Bot. – 1955. – Vol.42. – P.282–287.
12. **Beutler M.** Fluorometric depth-profiling of chlorophyll corrected for yellow substances. In: Arzul G (ed) Aquaculture environment and

marine phytoplankton/ Beutler M. [et al.]// IFREMER Brest. –2002. –P. 231–238
13. **Beutler M. A.** Fluorometric method for the differentation of algal populations in vivo and in situ/ Beutler M. [et al.]// Photosynth. Res. – 2002. –Vol. 72.–P.39–53.
14. **Briand, J.F.** Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems/ Briand, J.F. [et al.] //Vet. Res. –Vol.34. –P361-377.
15. **Sivonen K.** Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution/ Sivonen K. [et al.] // (eds A. Herrero & E. Flores) Caister Academic Press, Norfolk. –2008. – P. 159-197.
16. **Svirčev Z.** Leptospirosis distribution related to freshwater habitats inthe Vojvodina region (Republic of Serbia)/ Svirčev Z . [et al.] // Sci. China Ser. –2009. – Vol.10. –P.965-971.
17. **Chorus I.** Toxic cyanobacteriain water: a guide to their public health consequences,monitoring and management/ Chorus I. [et al.] // E & FN Spon London. –1999.
18. **Hoffmann L.** Nomenclature of Cyanophyta/Cyanobacteria: round table on the unification of the nomenclature under the Botanical and Bacteriological Codes/ Hoffmann L. [et al.] // Algol. Stud. –2005. –Vol. 117. –P.13–29.
19. **Gugger M.** Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales)/ Gugger M. [et al.] // Int. J. Syst.Evol. Microbiol. –2004. –Vol.54. – P.349–357.
20. **Neilan B.A.** rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic

cyanobacteria of the genus Microcystis/ Neilan B.A. [et al.] // Int J Syst Bacteriol. –1997. –Vol. 47. –P.693–697.
21. **Gugger M.** Genetic diversity of Cylindrospermopsis strains (Cyanobacteria) isolated from four continents / Gugger M. [et al.] //Appl. Env. Microbiol. – 2005. – Vol.71. – P. 1097–1100.

Приложение 1:
Extraction protocol kit QuiaGen (Cat No. 69506):
According to the Gram-negative bacterial DNA purification protocol (which includes cyanobacteria):
- take 2 mL of culture and place in a 15 mL falcon
- centrifuge for 10 min at 4000 rpm, remove the supernatant
- make 2 rinse cycles with milliQ water
add 180 µL of ATL buffer, then vortex

According to the animal tissue DNA purification protocol:
- make 2/3 cycles of freezing / thawing, (10min at -20 ° C / 5min at 55 ° C)
- add 20 µL of proteinase K, then vortex
- Incubate at 55 ° C for 3h, vortex every 30 min
- vortex for 15s
- add 200 µL of buffer AL, then vortex
- Incubate for 10 min at 70 ° C, then vortex
- add 200 µL of 100% ethanol, then vortex
- centrifuge for 3 minutes at 4000 rpm
- pipette the volume into the DNeasy spin column (2 mL)
- centrifuge at 8000 rpm for 1 min
- put the column in a new 2 mL tube
- add 500 µL of AW1 buffer
- centrifuge at 8000 rpm for 1 min
- put the column in a new 2 mL tube
- add 500 µL of AW2 buffer
-centrifuge at 14000 rpm to dry the membrane for 3 min
- centrifuge at 14000 rpm for 3 min in a new tube
- put the column in a new tube with plug
- add 100 µL of AE buffer
- Incubate for 1 min at room temperature
- centrifuge at 8000 rpm for 1 min
- add 50 µL of AE buffer in the same tube
- Incubate for 1 min at room temperature
- centrifuge at 8000 rpm for 1 min
- make a measurement of optical density (λADN = 260) before the PCR.
- conservation of the extract at -20 ° C

Приложение 2 :
Phenol-chloroform extraction protocol (according to U. Dorigo, INRA Thonon les Bains):
- take 2 ml of culture in an eppendorf tube
- centrifuge at 4 ° C at 4000 rpm for 10 min (instead of filtration)
- remove the supernatant and then wash twice with milliQ water
- add 750 µL of lysis buffer
centrifuge at 4 ° C at 4000 rpm for 10 minutes
- freeze at -80 ° C for 15 min
- defrost at 55 ° C for 2 minutes
- sonicate in an ultrasonic bath for 2 min, then vortex
- centrifuge 30s at maximum speed
- add 47 µL of lysosyme and incubate at 37 ° C for 45 minutes
- centrifuge 30s at max speed
- add 75 µL of SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) then 10 µL of proteinase K
- Incubate at 55 ° C for 1h30, vortex every 30 min
- freeze at -80 ° C for 5 min
- defrost at 55 ° C for 2 minutes
- sonicate in an ultrasonic bath for 2 min, then vortex, repeat 3 times
- add 10 µL of proteinase K
- Incubate at 55 ° C for 1h, vortex from time to time
- centrifuge 30s at max speed
- centrifuge at 4 ° C at 12000 rpm for 5 min
- recover the supernatant in a new eppendorf tube, record the volume harvested
purify with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol, centrifuge at 4 ° C. at 12000 rpm for 5 min, then recover the upper phase, which contains the DNA, in a new eppendorf tube
repeat the previous step until there are no more proteins at the interface of the two phases.
- remove the excess phenol-chloroform-isoamyl alcohol by adding an equal volume of chloroform-alcohol-isoamyl, centrifuge at 4 ° C at 12000 rpm for 5 min, then recover the upper phase in a new eppendorf tube
- add 10% of the sodium acetate volume
- add 200% of the volume of absolute ethanol to cold, observe a white precipitate, then mix by tube inversion
- keep at -80 ° C for 2 hours
centrifuge at 4 ° C at 12000 rpm for 30 min, then remove the supernatant
- wash the pellet with 300 µL of ethanol 80%
centrifuge at 4 ° C at 12000 rpm for 10 min, then remove the supernatant
- to dry the pellet, centrifuge at speed vac for 25 min
- add 50 µL of TE (EDTA tris)
solubilize the DNA at 37 ° C for 1 h and then overnight in the refrigerator
- make a measurement of optical density (λADN = 260) before the PCR.
-conservation of the sample at -20 ° C

Поступила в редакцию: 14.06.2019 г.

Хаффарессас Ясин, аспирант-микробиолог, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия, e-mail: yacinechabani@yandex.ru

Haffaressas Yacine, aspirant microbiologist, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia, e-mail: yacinechabani@yandex.ru

УДК 331.452

Шендакова Т.А., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент
ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет
им. Н.В. Парахина», Россия, г. Орёл
e-mail 89102003348@ya.ru

Shendakova T.A., Candidate of Agricultural Sciences, Docent
Federal State Budgetary Educational Establishment of Higher Education
«Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin», Orel, Russia

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ФАКТОРЫ В СТРУКТУРЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО РИСКА РАБОТНИКОВ ЖИВОТНОВОДСТВА

(Biological production factors in the structure of professional risk of livestock workers)

В статье рассмотрены основные факторы профессионального риска повреждения здоровья и предложена система управления профессиональным риском для работников животноводства. Обоснован комплексный подход к системе управления охраной труда и профессиональным риском животноводов.

The article deals with the main factors of the occupational health risk and suggests a system of the occupational risk management for livestock workers. The complex approach to the system of labor protection management and occupational risk of livestock workers is stated.

Ключевые слова: профессиональный риск, биологические производственные факторы, профессиональное заболевание, здоровье работников, профилактические мероприятия.

Key words: occupational risk, вbiological production factors, occupational disease, health of staff, preventive actions.

Управление профессиональным риском рассматривается в настоящее время как часть системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и сохранения здоровья работающего населения России. По данным Росстата, на конец 2016 года 30,8% работников, осуществляющих деятельность по сельскому хозяйству, охоте и лесному хозяйству, заняты на работах с вредными и (или) опасными условиями труда (табл. 1).

Таблица 1 – Численность работников, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, осуществляющих деятельность по сельскому хозяйству, охоте и лесному хозяйству (на конец 2016 года)

Списочная численность работников	Занятые на работах с вредными и (или) опасными условиями труда	из них работающие под воздействием факторов										
		производственной среды									трудового процесса	
		химический фактор	биологический фактор	аэрозоли преимущественно фиброгенного действия	шум, ультразвук воздушный, инфразвук	вибрация	неонизирующее излучение	ионизирующее излучение	микроклимат	световая среда	тяжесть	напряженность
человек												
1043740	321471	55954	22803	20411	97048	56226	5787	909	49860	50513	166274	58969
в %												
100	30,8	5,4	2,2	2	9,3	5,4	0,6	0,1	4,8	4,8	15,9	5,7

Трудовая деятельность работников животноводства протекает в неблагоприятных условиях микроклимата (4,8% занятых), при постоянном контакте с условно-патогенной и патогенной микрофлорой.

Основным источником условно-патогенной и патогенной микрофлоры являются животные, продукты их жизнедеятельности и сухие комбикорма. Микробное загрязнение воздушной среды производственных помещений животноводческих ферм и комплексов, представляющее биологическую опасность, является одним из ведущих гигиенических факторов риска формирования общей и профессиональной заболеваемости животноводов. В соответствии с ГОСТ Р 12.0.006-2002 «Общие требования к управлению охраной труда в организации» и с международными стандартами по Системе управления охраной труда на предприятиях необходимо вводить и поддерживать порядок непрерывного выявления опасных факторов,

оценки риска и принятия мер для снижения уровня риска, разрабатывать профилактические и корректирующие мероприятия на основе результатов мониторинга условий труда.

21 февраля 2015 г. вступил в силу приказ Минтруда России от 24 января 2015 г. № 24н, который изменил подходы к оценке биологического фактора при проведении специальной оценки условий труда, основной процедуры, обеспечивающей оценку физиологически важных параметров производственной среды и разработку мероприятий, направленных на их улучшение [3]. Микробный фактор является обязательным для контроля, что находит отражение в «Перечне вредных и (или) опасных производственных факторов, при наличии которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования)» (Приложение №1 к приказу Минсоцразвития России № 342н от 26 апреля 2011 г.) и в более ранних редакциях документа.

Измерения содержания патогенных микроорганизмов в воздухе рабочей зоны проводятся только при работе с микроорганизмами-продуцентами, живыми клетками и спорами, содержащимися в бактериальных препаратах. Это «закрытые» («режимные») организации, научно-исследовательские центры, институты, лаборатории по изготовлению вакцин, бактериальных препаратов, токсинов и т.п., в т.ч. военные и военизированные.

Во всех других случаях оценка условий труда проводится без измерений. При этом установление классов вредности (оценка биологического фактора) проводится только при выполнении работ с патогенными микроорганизмами (диагностических, экспериментальных, производственных) в отношении:

- рабочих мест организаций, осуществляющих деятельность в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных и (или) в замкнутых системах генно-инженерно-модифицированных организмов III и IV степеней потенциальной опасности при наличии соответствующих разрешительных документов (лицензии) на право осуществления такой деятельности (это узкоспециализированные учреждения, НИИ, лаборатории);
- рабочих мест организаций, осуществляющих деятельность в области использования в замкнутых системах генно-инженерно-модифицированных организмов II степени потенциальной опасности (это узкоспециализированные учреждения, НИИ, лаборатории);
- рабочих мест медицинских и иных работников, непосредственно осуществляющих медицинскую деятельность (государственные и коммерческие медицинские организации);
- рабочих мест работников, непосредственно осуществляющих ветеринарную деятельность, государственный ветеринарный надзор и (или) проводящих ветеринарно-санитарную экспертизу (государственные и коммерческие ветеринарные организации; некоторые подразделения и специалисты государственного ветеринарного надзора; некоторые подразделения и специалисты ветеринарно-санитарной экспертизы, в т.ч. в местах торговли, хранения сельхозпродукции, на сельхозрынках) [3].

Вместе с тем, на животноводческих предприятиях при специальной оценке условий труда влияние микробного фактора оценивается только для рабочих мест ветеринарных работников, в то время как профессиональные заболевания регистрируются у работников по уходу за животными и дояров. В производственных помещениях животноводческих и птицеводческих ферм и комплексов контроль микробной загрязненности среды не проводится [3].

Основным источником условно-патогенной и патогенной микрофлоры являются животные, продукты их жизнедеятельности и сухие комбикорма. Существует около 25 болезней животных, около 10 болезней птицы, вызывающих у работников профессиональные заболевания [3, 4, 7, 10]. В общей численности занятых инфицирование ветеринарных работников достигает 20-65%, чабанов - 25-100%, доярок - 15-30%, пастухов, скотников - 25-53%. В структуре профессиональной патологии работников животноводства доля бруцеллеза превышает 90%, а доля всех инфекционных и паразитарных заболеваний – 65% [9-13].

По результатам собственных исследований в воздухе телятника были обнаружены золотистый стафилококк 265 КОЕ в 1м^2, гемолитический стрептококк 186 КОЕ в 1м^2, а также дрожжеподобные плесневые грибы в количестве 50 КОЕ в 1м^2, несмотря на соблюдение требований санитарных правил [7], требований к содержанию помещения [6], своевременное проведение дезинфекции, соблюдении технологии содержания крупного рогатого скота.

Исследования многих ученых подтверждают, что микробное загрязнение воздушной среды производственных помещений животноводческих ферм и комплексов, представляющее биологическую опасность, является одним из ведущих гигиенических факторов риска формирования общей и профессиональной заболеваемости животноводов [1, 2, 4, 9-12]. В связи с этим возникает необходимость в изменении подходов к оценке биологического фактора при проведении СОУТ, а также в усилении профилактической работы и средств защиты от микроорганизмов для работников животноводства.

В воздухе рабочей зоны могут присутствовать химические соединения, используемые для дезинфекции и дезинсекции помещений (формалин, хлор, хлор-бетта-нафтол, лизол, хлорофос и пр.). Например, в первые часы после обработки помещений формальдегид обнаруживается в концентрациях, превышающих ПДК от 2 до 10 раз, формируя вредные условия труда 4 степени (класс 3.4) [1, 2, 9, 10].

Современные технологии в животноводстве механизированы и автоматизированы: кормление, поение животных, удаление навоза, уборки, дезинфекции помещений и оборудования, приготовления кормов, что создает повышенный уровень шума и вибрации на рабочих местах. Количество работающих под воздействием этих факторов производственной среды – 9,3 и 5,4% соответственно.

Трудовой процесс животноводов характеризуется высокой интенсивностью, эмоциональным напряжением, чрезмерными физическими и статическими нагрузками при выполнении работ вручную, выпол-

нением рабочих операций в неудобных вынужденных положениях тела с длительным ортостазом и переходами [6, 10].

Скотоводческие помещения не отапливаются, поэтому из всех факторов микроклимата наиболее важную роль играет температура воздуха в помещении, а также температура полов и других поверхностей, т. к. она непосредственно влияет на терморегуляцию, теплообмен, на обмен веществ в организме и другие процессы жизнедеятельности [7, 8].

В поддержании параметров микроклимата на уровне на уровне зоотехнических и санитарно-гигиенических требований большую роль играют конструкция дверей, ворот, наличие тамбуров, которые в зимнее время открываются при раздаче кормов мобильными кормораздатчиками и при уборке навоза бульдозерами [1, 3, 4]. Помещения часто переохлаждаются, работники и животные страдают от простудных заболеваний.

Около 40% всей заболеваемости животноводов, работающих с крупным рогатым скотом, составляют болезни органов дыхания, простудные заболевания, обусловленные воздействием на работающих вредных производственных факторов (табл. 2).

Таблица 2 – Нозологические группы и формы болезни животноводов (обобщённая информация)

Нозологические группы и формы болезни	Комплекс по откорму КРС		Молочно-товарный комплекс	
	случаи	дни	случаи	дни
Болезни нервной системы и органов чувств, всего	9-8	87-80	6-8	52-70
В том числе болезни периферических нервов и ганглиев	7-6	73-70	4-5	34-50
Болезни органов дыхания, всего	40-42	331-310	42-53	262-380
В том числе острые респираторные заболевания верхних дыхательных путей	22-28	160-180	34-43	18-26
Болезни органов пищеварения, всего	9-7	15-14	6-7	11-16
В том числе гастрит, дуоденит	30-30	24-20	10-10	28-40
Болезни мочеполовых органов, всего	10-9	118-110	30-40	32-50
В том числе болезни женских половых органов	50-40	70-70	10-20	19-30
Болезни кожи и подкожной клетчатки, всего	4-3	28-30	3-4	19-3
В том числе инфекции кожи и подкожной клетчатки	3-3	180-20	2-2	11-2

По данным Росстата (табл. 3), для 333047 работников, осуществляющих деятельность по сельскому хозяйству, охоте и лесному хозяйству, установлен хотя бы один вид гарантий и компенсаций за работу во вредных условиях труда. Для 28,8% работников предусмотрено проведение медицинских осмотров, оплату труда в повышенном размере получают 17,2% работников и 11,5% – ежегодный дополнительный оплачиваемый отпуск.

Таблица 3 – Численность работников по видам компенсаций за работу с вредными и (или) опасными условиями труда, осуществляющих деятельность по сельскому хозяйству, охоте и лесному хозяйству (на конец 2016 года)

Списочная численность работников	Численность работников, которым установлен хотя бы один вид гарантий и компенсаций	из них имеющих право на							Списочная численность работников, получающих бесплатно спецодежду, спецобувь и другие средства индивидуальной защиты, всего	Из нее, занятых на работах с вредными и (или) опасными условиями труда
		ежегодный дополнительный оплачиваемый отпуск	сокращенную продолжительность рабочего времени	лечебно-профилактическое питание	молоко или другие равноценные пищевые продукты	оплату труда в повышенном размере	проведение медицинских осмотров	досрочное назначение страховой пенсии по старости		
человек										
1043740	333047	119944	32923	761	65637	178961	269133	19330	732523	312042
%										
100	31,9	11,5	3,2	0,1	6,3	17,2	25,8	1,9	70,2	29,9

Мероприятия для снижения профессионального риска повреждения здоровья для работников животноводства должны носить системный профилактический характер [2, 5, 10]. Предлагаемая нами схема управления профессиональным риском для здоровья работников животноводства представлена на рис. 1.

Учитывая специфику отрасли, следует отметить, что необходим комплексный подход к системе управления охраной труда и профессиональным риском животноводов. Большая роль должна отводиться строгому отбору в профессию с целью первичной медицинской профилактики риска развития у работников животноводства профессиональных заболеваний.

<table>
<tr><td colspan="6">Система управления профессиональным риском для работников животноводства</td></tr>
<tr><td>Предварительные медицинские осмотры</td><td>Профессиональный отбор</td><td>Производственный контроль и мониторинг состояния условий труда</td><td>СОУТ</td><td>Социально-гигиенический мониторинг</td><td>Пропаганда здорового образа жизни и отказа от вредных привычек</td></tr>
<tr><td colspan="6">Разработка программ сохранения здоровья</td></tr>
<tr><td colspan="2">Периодические медицинские осмотры</td><td colspan="4">Устранение и/или минимизация уровней и экспозиции вредных производственных факторов</td></tr>
<tr><td colspan="3">Диагностика профзаболевания, прогноз вероятности развития профзаболевания</td><td colspan="3">Формирование группы риска</td></tr>
<tr><td colspan="2">Медицинская реабилитация лиц, получивших профзаболевание</td><td colspan="2">Социальная защита лиц, работающих во вредных условиях труда, и лиц, получивших профзаболевание</td><td colspan="2">Применение средств индивидуальной и коллективной защиты</td></tr>
<tr><td colspan="6">Мониторинг финансовых затрат, связанных с ущербом для здоровья и безопасности работников</td></tr>
</table>

Рис. 1 – Система управления профессиональным риском для работников животноводства

Производственный контроль – совокупность мероприятий, направленных на оценку экологической обстановки на предприятии с целью оценить химическую, бактериологическую загрязнённость производства, выявить факторы, способные повлиять на здоровье сотрудников и экосистемы. В программу производственного контроля животноводческого предприятия целесообразно включить как технический контроль оборудования комплекса, так и общую культуру производства – отношение работников к технике, животным и к своим обязанностям. Энергетический контроль должен включать измерение теплопотерь животноводческих помещений. Проверка соответствия производственной деятельности требованиям экологической безопасности, контроль утилизации навоза и других отходов животноводства способствует поддержанию нормальной экологической обстановки на значительной территории. Руководитель объекта обязан следить за состоянием атмосферы в зоне предприятия, за водными источниками, прилегающими к территории, за земельными участками, принадлежащими предприятию. Санитарный контроль содержания патогенной микрофлоры воздуха животноводческих помещений, оборудования машинного доения позволит оперативно подключить дополнительные меры дезинфекции, что будет способствовать оздоровлению и улучшению условий труда, а соответственно, снижению риска заболевания работников и животных, улучшению качества молока. В рамках финансового контроля можно установить, насколько рационально финансируются мероприятия по охране труда, провести социально-экономическую оценку системы управления охраной труда на предприятии.

В свете последней редакции закона "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" от 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ, а также Постановлений Правительства Российской Федерации от 2 февраля 2006 г. № 60 «Об утверждении Положения о проведении социально-гигиенического мониторинга» и от 16 мая 2005 г. N 303 «О разграничении полномочий федеральных органов исполнительной власти в области обеспечения биологической и химической безопасности» социально-гигиенический мониторинг проводится Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека совместно с другими федеральными органами исполнительной власти, уполномоченными осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

В виду наличия вредных условия труда на рабочих местах животноводческих предприятий и ряда профессиональных заболеваний работников отрасли необходимо осуществлять мониторинг следующих факторов: биологических (вирусные, бактериальные, паразитарные); химических, физических (шум, вибрация, ультразвук, инфразвук, тепловое, ионизирующее, неионизирующее и иные излучения); социальных (структура и качество питания, водоснабжение, условия быта, труда и отдыха), с целью выявления причинно-следственных связей между состоянием здоровья работников отрасли и воздействием факторов производственной среды на основе системного анализа и оценки риска для здоровья населения.

Установлено, что к наиболее эффективным мерам профилактики травматизма в отрасли являются воспитательные и пропагандистские, которые направлены главным образом на профилактику мотивационной части действий (нежелание человека выполнять правила безопасности), ориентировочной части действий (незнание правил безопасности, норм охраны труда, а также способов выполнения безопасных действий) и исполнительской части действий (невыполнение правил безопасности из-за отсутствия физической и (или) психологической возможности сделать это, например вследствие плохой координации, при нахождении человека в состоянии алкогольного опьянения и т.п.).

Курение и злоупотребление алкоголем являются самыми опасными вредными привычками и приносят огромнейший вред не только лицам, страдающим этими привычками-заболеваниями, но и производству. Около 45% всех случаев травматизма в животноводстве связано с алкогольным опьянением пострадавших. Рост смертности трудоспособного населения вследствие алкоголизма оказывает влияние на формирование трудовых ресурсов. В таких условиях работодатель обязан включить пропаганду здорового образа жизни и отказ от вредных привычек в обязанность специалиста по охране труда.

Основными мерами снижения профессионального риска для здоровья работников животноводства могут явиться:

организационно-технические мероприятия, учитывающие модернизацию оборудования, являющегося источником вредных факторов (шума, вибрации, выделения пыли и вредных веществ в воздух рабочей зоны и т.д.);

внедрение комплексной автоматизации производственных процессов;

обеспечение работников сертифицированными средствами индивидуальной защиты;

регламентация времени контакта с вредными и опасными факторами путем соблюдения рациональных режимов труда и отдыха;

своевременное проведение производственного контроля соблюдения санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий;

функционирование на предприятиях медицинских кабинетов, спортивных площадок и залов, внедрение производственной гимнастики, проведение сезонной профилактики респираторных заболеваний;

ответственное отношение к диспансеризации, как к механизму выявления и предупреждения развития различных заболеваний у населения;

медико-профилактические мероприятия, включающие предварительные и периодические медицинские осмотры, своевременное направление лиц с подозрением на наличие профессионального заболевания в центры профпатологии на экспертизу связи заболевания с профессией; взятие на учет и диспансерное наблюдение лиц с нарушениями здоровья; своевременное лечение и реабилитация лиц, получивших производственно обусловленные и профессиональные заболевания.

социальная защита лиц, работающих во вредных условиях труда, и лиц, получивших профзаболевание.

Обязательным элементом системы управления профессиональным риском для работников животноводства должен быть мониторинг финансовых затрат, связанных с ущербом для здоровья и безопасности работников.

Таким образом, система управления профессиональным риском работников животноводства является многокомпонентной, требует комплексного подхода и непрерывной работы над решением основной задачи – сохранением жизни и здоровья каждого работника отрасли, достижения социального эффекта и получения экономического результата.

Литература

1. **Баранов Ю.Н.** Этиолого-физиологический аспект в охране труда работников животноводства / Ю. Н. Баранов. - Орел, с. / Ю. Н. Баранов, Б. М. Тюриков / Материалы XLVI Международной научно-технической конференции «Достижения науки – агропромышленному производству». Ч. 3. Челябинск: ЧГАУ, 2007.- С. 120-124;
2. **Михайлова Н.А.** Гигиенические аспекты снижения профессиональных рисков для здоровья работников животноводства / Н. А. Михайлова // Санитарно-эпидемиологическое благополучие Российской Федерации: материалы Конгресса. - М., 2009.-С.144-145.
3. **МР** Условия труда и режим отдыха свиноводческих комплексов.
4. **МР** Условия труда и режим отдыха на промышленных комплексах КРС.
5. **Профессиональный риск** для работников сельского хозяйства; гигиенические аспекты его оценки и управления (обзор литературы) / Т.А. Новикова, В.Ф. Спирин, Н.А. Михайлова, В.М. Таранова // Медицина труда и промышленная экология.-2012.-№5.-С.22-28.
6. **Р 2.2.2006-05** Руководство по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда.
7. **СНиП 2.10.03-84** Животноводческие, птицеводческие и звероводческие здания и помещения.
8. **СП 4542-87** Санитарные правила для животноводческих предприятий.
9. **Щкрабак Р.В.** Анализ положений по влиянию запыленности воздуха на риск заболеваемости операторов и их работоспособности в животноводстве / Р. В. Шкрабак // Известия СПбГАУ.-2009.-№17.-С.201-204.
10. **Федеральный закон** "О специальной оценке условий труда" от 28.12.2013 N 426-ФЗ
11. **Шендакова Т.А.** Безопасность труда в животноводстве. Учебное пособие для бакалавров, обучающихся по направлению 20.03.01 Техносферная безопасность/Т.А. Шендакова, К.С.

Лактионов, Тимохин О.В., Алибекова И.В., Орел, 2014г.

12.**Шендакова Т.А.** Источники профессиональных заболеваний и заболеваний с временной утратой трудоспособности работников животноводства/ Т.А. Шендакова, К.В. Коченков // Молодёжь и системная модернизация страны [Текст]: Сборник научных статей 2-й Международной научной Конференции студентов и молодых ученых (25-26 мая 2017 года), в 4-х томах, Том 4, Юго-Зап. гос. ун-т., ЗАО «Университетская книга», Курск, 2017, 385-389 с.

13.**Шендакова Т.А.** Влияние качества воздушной среды животноводческих помещений на здоровье работников//материалы 1-й международной научно-технической интернет-конференции «Ключевые проблемы безопасности развития природно-промышленных систем», Орел: Издательство Приокский государственный университет, 2016, С. 55–69.

Поступила в редакцию: 12.08.2019 г.

Шендакова Татьяна Алексеевна, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры техносферной безопасности ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина», Россия, г. Орёл, тел. +7 (4862) 43-03-17, e-mail 89102003348@ya.ru

Для заметок

scientia, virtus, libertas