

СОДЕРЖАНИЕ

Том 142, номер 6, 2022

Секвестрация углерода в почве: факты и проблемы (аналитический обзор) <i>В. Н. Кудеяров</i>	545
Болота и антропогенно-измененные торфяники: углерод, парниковые газы, изменение климата <i>А. А. Сирин</i>	560
Обзор основных таксономических групп микроорганизмов в почвах зонального ряда по данным метагеномного анализа и флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> <i>Д. А. Юриенас, Н. Н. Каширская</i>	578
О периодических колебаниях численности клеток микроорганизмов в природе и в чистой культуре: к третьему закону популяционной экологии в микробиологии <i>А. М. Семенов, А. А. Шаталов, Е. В. Семенова</i>	591
Следы древней антропогенной деятельности в почвах (на примере поселения эпохи бронзы Арбакол-1 в Кисловодской котловине) <i>А. А. Петросян, Т. Э. Хомутова, Н. Н. Каширская, Д. С. Коробов, А. В. Борисов</i>	603
Роль травяных биомов в диверсификации насекомых-фитофагов <i>А. Ф. Сафонкин, Т. А. Триселева, А. А. Яцук</i>	615
Формирование агрегатов в культуре клеток высших растений: роль компонентов клеточных стенок <i>Е. И. Григорьева, Ю. В. Сидорчук, Е. В. Дейнеко</i>	624
Клеточные технологии в экспериментальной терапии повреждений нерва (проблемно-аналитический обзор) <i>Е. С. Петрова</i>	638
Композит хитозана с аспарагиновой кислотой и его влияние на свертывание крови в условиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> <i>Л. А. Ляпина, М. Е. Григорьева, Т. Ю. Оберган, Т. А. Шубина</i>	650
Инновационные технологии в интерпретации результатов традиционного клинико-лабораторного обследования больных неспецифическими воспалительными заболеваниями легких и гнойно-воспалительными заболеваниями <i>В. М. Земсков, А. М. Земсков, А. А. Барсуков, М. Н. Козлова, В. А. Земскова, Н. С. Шишкина, В. С. Демидова</i>	656

Contents

Vol. 142, No. 6, 2022

Soil Carbon Sequestration: Facts and Challenges (Analytical Review) <i>V. N. Kudeyarov</i>	545
Peatbogs and Anthropogenically Modified Peatlands: Carbon, Greenhouse Gases and Climate Change <i>A. A. Sirin</i>	560
Overview of the Main Taxonomic Groups of Microorganisms in Zonal Soils According to Metagenomic Analysis and <i>in situ</i> Fluorescent Hybridization <i>D. A. Yurshenas, N. N. Kashirskaya</i>	578
About Periodic Fluctuations in the Number of Microorganisms Cells in Nature and in Pure Culture: To the Third Law of Population Ecology in Microbiology <i>A. M. Semenov, A. A. Shatalov, E. V. Semenova</i>	591
Traces of Ancient Anthropogenic Activity in the Soils (on the Example of the Bronze Age Settlement Arbakol-1 in the Kislovodsk Basin) <i>A. A. Petrosyan, T. E. Khomutova, N. N. Kashirskaya, D. S. Korobov, A. V. Borisov</i>	603
The Role of Grass Biomes in Diversification of Phytophagous Insects <i>A. F. Safonkin, T. A. Triseleva, A. A. Yatsuk</i>	615
Aggregates Formation in Higher Plants Cell Culture: The Role of Cell Wall Components <i>E. I. Grigoreva, Y. V. Sidorchuk, E. V. Deineko</i>	624
Cell Technologies in Experimental Therapy of Nerve Injuries (Analytical Review) <i>E. S. Petrova</i>	638
Chitosan Composite with Aspartic Acid and Its Effect on Blood Coagulation <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> <i>L. A. Lyapina, M. E. Grigorjeva, T. Y. Obergan, T. A. Shubina</i>	650
Innovative Technologies in Interpreting the Results of Traditional Clinical and Laboratory Examination of Patients with Nonspecific Inflammatory Lung Diseases and Purulent Inflammatory Diseases <i>V. M. Zemskov, A. M. Zemskov, A. A. Barsukov, M. N. Kozlova, V. A. Zemskova, N. S. Shishkina, V. S. Demidova</i>	656

УДК 9.929+57.557+50.502/504

СЕКВЕСТРАЦИЯ УГЛЕРОДА В ПОЧВЕ: ФАКТЫ И ПРОБЛЕМЫ (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР)

© 2022 г. В. Н. Кудеяров^{1, 2, *}¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, ФИЦ “Пушчинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Московская обл., Россия²Институт фитопатологии РАН, пос. Большие Вязёмы, Московская обл., Россия

*e-mail: vnikolaevich2001@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 11.04.2022 г.

Принята к публикации 11.04.2022 г.

Представленная работа посвящена оценке секвестрации углерода в зависимости от приемов обогащения почвы органическими материалами. Уровень дополнительной секвестрации в почвах необходимо определять при учете затрат чистой первичной (NPP) и экосистемной (NEP) продукции фотосинтеза на величину нового стока устойчивого к минерализации органического углерода – чистой биомассной продукции (NBP). Сток углерода в легко минерализуемые формы NEP определяет краткосрочную секвестрацию углерода. Средне- и долговременная секвестрация представляет собой накопление углерода в почве в NBP-пуле. Трансформация органического углерода в системе NPP–NEP–NBP-пулов является длительным процессом гумификации и сопровождается потерей углерода в атмосферу в виде CO₂.

Ключевые слова: почва, секвестрация, круговорот и баланс углерода, органические удобрения, дыхание почвы

DOI: 10.31857/S0042132422060047

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире ярко обозначились проблемы, без срочного решения которых невозможно дальнейшее развитие человеческого общества. С одной стороны, ограниченность земельных ресурсов, несмотря на выдающиеся успехи мирового земледелия, лимитирует производство продовольствия для населения Земли. С другой – хозяйственная деятельность человека становится причиной нарушения не только благополучного состояния среды обитания человека, но и фактором изменения климата на Земле. Считают, что главной причиной изменения климата является нарастание парникового эффекта атмосферы Земли за счет растущих эмиссий парниковых газов (CO₂, CH₄ и N₂O). Человечество стоит перед лицом глобальной проблемы, как при продолжающемся росте мирового производства и энергопотребления снизить эмиссию парниковых газов. Производство сельскохозяйственной и промышленной продукции не откажется от традиционных видов энергии, хотя сокращение их потребления неизбежно. При этом для снижения парникового эффекта необходимы не только значительное сокращение выбросов парниковых газов в атмо-

сферу, но и новые технологии отъема из нее CO₂ (секвестрация).

Для разрешения проблемы секвестрации CO₂ взоры обращаются, прежде всего, на возможность увеличения абсорбции углекислоты почвенно-растительными экосистемами, поскольку почва является основным хранилищем углерода и ей принадлежит главная роль в секвестрации CO₂ атмосферы. Время пребывания углерода в гумусе почв может достигать 4000 лет и более. В то время как в древесной растительности углерод пребывает, в основном, немногим более 100 лет.

Отношение гетеротрофного дыхания почв к общим запасам в ней органического углерода (C_{орг}) – наиболее важный фактор в оценке уровня секвестрации углерода в почвах. Так, проанализированы (Tian H. et al., 2015) десять моделей, описывающих вековое изменение (1901–2010 гг.) соотношений изменения запасов почвенного органического вещества и R_h (soil heterotrophic respiration) – гетеротрофного дыхания почв. Все десять моделей показали, что установленные мировые запасы почвенного органического вещества находились в интервале от 425 до 2111 Гт С с медианой 1158 Гт С для 2010 г. Оцененные величины запасов углерода в почвах Земного шара имеют

большой разброс. Некоторые исследователи полагают, что запасы $C_{\text{орг}}$ в почвенной толще многолетней мерзлоты, занимающей около 18% от всего почвенного покрова Земли, составляют 1466 Гт (Tarnocai et al., 2009). По данным IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) на 2013 г. (IPCC, 2013), почвенный резервуар планеты в метровом горизонте содержит 1500 Гт $C_{\text{орг}}$. Эта величина принята в качестве официальной при расчетах глобального баланса углерода. В наземной растительности углерода в 3–4 раза меньше, чем в почвенной толще. В российских почвах (слой 0–100 см) находится около 300 Гт $C_{\text{орг}}$ (Орлов и др., 1996), что примерно в 6–7 раз больше, чем во всей наземной растительности страны.

Модели (Tian H. et al., 2015) показали и большой разброс величин гетеротрофного дыхания почв – от 35 до 69 Гт С/год с медианой 51 Гт С/год – в течение 2001–2010 гг., и то, что R_h является доминантным путем потерь углерода из пула почвенного $C_{\text{орг}}$ и определяющим фактором MRT (mean residence time) – среднего времени его пребывания в почве. Вариация MRT $C_{\text{орг}}$ почвы с учетом R_h была определена в диапазоне 10.8–39.3 года. Авторы также установили тесную зависимость между R_h и NPP (net primary production of photosynthesis) – первичной продукцией фотосинтеза: за 100-летний период среднее отношение этих величин (R_h/NPP) составило 92%.

Несмотря на рост концентрации CO_2 в атмосфере и выпадений азотосодержащих соединений, способствующих улучшению азотного питания растений, все модели согласованно показали, что изменение климата и характера землепользования оказывали отрицательное влияние на запасы $C_{\text{орг}}$ в почвах. Весь ансамбль моделей показал, что MRT почвенного органического углерода в пуле за прошлое столетие уменьшилось на 4.4 года.

Приведенные выше данные свидетельствуют, что современная ситуация в мире, очевидно, не способствует перелому тренда изменения накопления $C_{\text{орг}}$ в почвах, поскольку с потеплением климата усиливаются азото- и углеродо-минерализационные процессы в почвах, дефляция, обезлесивание и опустынивание, что приводит к потерям гумуса и повышению эмиссии парниковых газов.

Процессы превращения азот- и углеродсодержащих веществ в почвах неразрывно связаны между собой, но судьба конечных продуктов минерализации (CO_2 и минерального азота в виде аммония NH_4^+) различается: CO_2 в основном улетучивается в атмосферу, а NH_4^+ включается в процессы ассимиляции растениями и микроорганизмами.

Значительная часть азотосодержащего органического вещества подвергается гумификации. Для органического вещества подавляющего числа почв

отношение С : N довольно стабильно – находится в пределах 10.0–11.0 и мало зависит от основных физико-химических свойств почвы. Эти показатели действительны для гумусовых горизонтов почв (0–25, 0–40 см). В более нижних горизонтах величина С : N снижается за счет увеличения содержания минерального азота в его общем пуле (в основном NH_4^+ , фиксированного глинистыми трехслойными минералами) (Kowalenko, Cameron, 1978; Kudeyarov, 1981; Soon, 1998; Morford et al., 2016; Houlton et al., 2018).

На рис. 1 приведены данные величин С : N гумуса в различных типах почв европейской и азиатской частей РФ. Выборка данных была сделана из многотомного труда “Агрохимическая характеристика почв СССР”, изданного в 1964–1968 гг. в издательстве “Наука” под редакцией чл.-кор. АН СССР А.В. Соколова (Агрохимическая..., 1962, 1963, 1964а,б, 1966, 1968, 1972).

Отношение углерода к азоту в почвах является довольно устойчивым показателем для подавляющего числа почв, независимо от типа и климатических условий. Этот факт лишь подтверждает принципиально идентичные условия формирования природных гумусовых веществ (гуминовых и фульвокислот). Показано (Кононова, 1963; Александрова, 1980), что содержание азота в гуминовых и фульвокислотах мало различается между типами почв, но состав гумуса, в первую очередь отношение гуминовых кислот к фульвокислотам, зависит от типа почв и условий почвообразования. Устойчивость показателя С : N гумуса для различных почв свидетельствует о механизме стехиометрии в почвенном органическом веществе, что подтверждается синхронностью высвобождения CO_2 и NH_4^+ при минерализации гумусовых веществ почв. Отношение С : N в гумусе можно рассматривать как матрицу устойчивости органического вещества в почве.

Органические материалы, поступающие в почву, например растительные остатки, органические удобрения (навоз, компосты, сидераты), всегда имеют более широкое отношение С : N, чем почвенный гумус. При разложении в почве вновь поступившего органического материала активизируется дыхательный процесс и возрастает эмиссия CO_2 в атмосферу. Минеральные азотные соединения под воздействием микроорганизмов вступают в новый цикл взаимодействия с органическим углеродом, образуя соединения с С : N, свойственным данной почве. Насыщение почвы органическими материалами в целом ведет к повышению содержания органического вещества в почвах, но и его минерализация также ускоряется, а С : N в гумусе почвы приближается к уровню до внесения удобрений. Об этом свидетельствуют данные многолетних полевых опытов с применением орга-

нических и минеральных удобрений (Городний, 1960; Горшков, 1960; Любарская, 1960; Соболев, Чернецкий, 1960; Шевелев, 1960; Шевцова, 1988; Хлыстовский, 1992; Rothamsted research, 2006).

Специфика биогеохимического круговорота углерода такова, что поступающее в почву органическое вещество растительного и животного происхождения быстро подвергается атаке почвенной биоты и включается в новые минерализационно-иммобилизационные циклы, которые могут повторяться в почве до 8–9 раз за сезон (Yevdokimov, Vlagodatsky, 1993).

Процесс гумификации органических остатков в почве происходит с участием биоты, и потери углерода (CO₂) в результате дыхательного процесса продолжаются непрерывно даже в том случае, когда в почву не поступают свежие порции растительного материала. Например, в погребенных под курганами почвах микробиологическая активность продолжается, хотя и очень медленно (Демкин, 1997).

Круговорот органического углерода в биосфере включает в себя следующие этапы (Mellilo et al., 1995): общая первичная продукция фотосинтеза GPP (gross primary product of photosynthesis), представляющая весь связанный в органическое вещество углерод; чистая первичная продукция фотосинтеза NPP представляет углерод, ассимилированный растениями, за вычетом дыхания растений; чистая экосистемная продукция NEP (net ecosystem production of photosynthesis) – результат годичного взаимодействия продуцентов и деструкторов экосистемы – выражается разностью между первичной продукцией NPP и дыханием R_h органотрофов: NEP = NPP – R_h. Фактически для биосферных балансовых расчетов именно эта величина имеет первостепенное значение. В NEP входит также вторичная продукция, составляющая грибную и микробную биомассу. В экосистемах NEP устанавливается как величина чистого экосистемного CO₂-газообмена NEE (net ecosystem CO₂-exchange), и эти величины равны между собой. Чистая биомная продукция NBP (net biome production) – это сумма гумусовых веществ, устойчивых к минерализации, со средним временем пребывания углерода в них десятки и сотни лет.

MRT углерода в названных пулах (ориентировочно): NPP – 1–2 года, NEP – ≈10–100 лет и NBP – ≈100 лет и дольше. По массе между пулами углерод распределяется в отношении NPP : NEP : NBP ≈ 100 : 10 : 1. В результате в почве на длительное время (>100 лет) могут закрепиться устойчивые к разложению гумусовые вещества – примерно около 1% от количества NPP-углерода, поступившего в почву с наземной и внутрипочвенной биомассой. Об этом свидетельствуют скорости роста мощности гумусового горизонта в процессе почвообразовательного про-

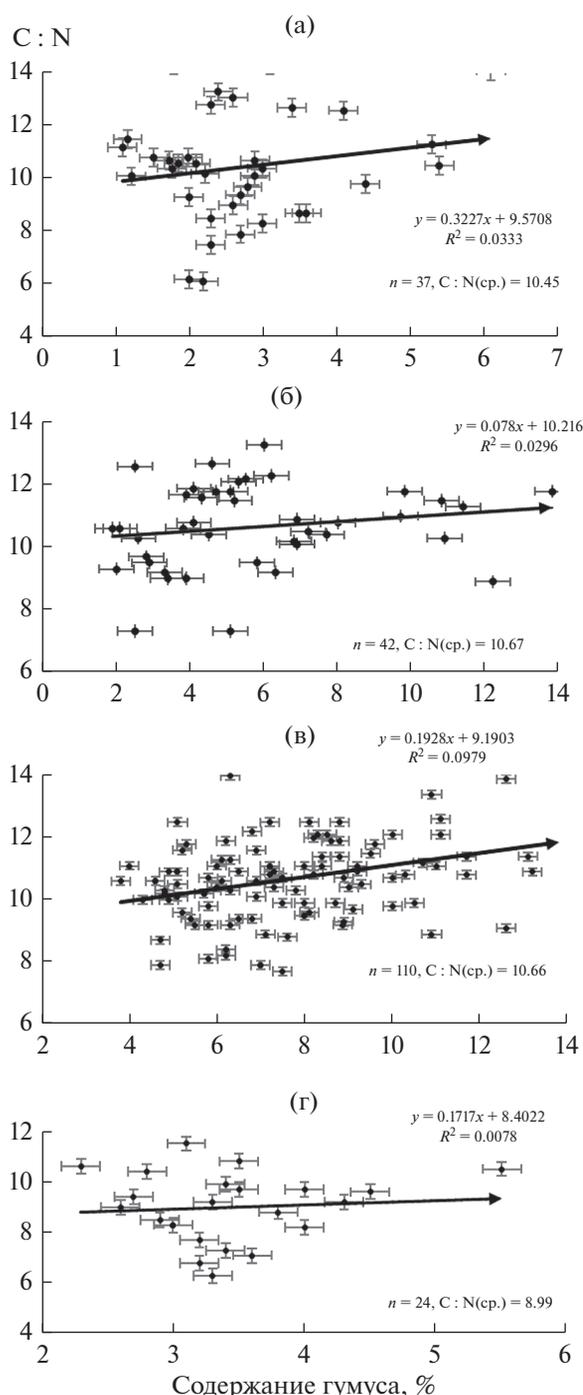


Рис. 1. Содержание в почвах гумуса (ось абсцисс) и C : N в гумусе (ось ординат). (а) – дерново-подзолистые почвы, (б) – серые лесные почвы, (в) – черноземы, (г) – каштановые; n – выборка данных из “Агрохимическая характеристика почв СССР”, тт. 1–4, 6, 9. Статистическая обработка автора.

цесса. С использованием методов археологического почвоведения показано (Иванов, Табанакова, 2003), что в черноземах Восточной Европы прирост гумусового горизонта за последние 4–5 тыс. лет оценивается в 1–3.5 см в столетие.

Это соответствует образованию в почве устойчивых к разложению гумусовых веществ — NBP — порядка 60–180 кг $C_{\text{орг}}$ /га/год. А текущая эмиссия CO_2 (гетеротрофное дыхание) из пахотных почв (например, серых лесных) в среднем составляет 2–3 т $C-CO_2$ /га/год (Kurganova, 2003; Kurganova et al., 2010). Для образования 60–180 кг C /га/год биомной продукции требуется поступление в почву углерода биомассы — NPP — порядка 6–8 т/га/год. Анализ биопродуктивности современных степных экосистем показал, что NBP черноземов может составлять около 80 кг C /га/год (Кудеяров и др., 2007).

С позиций секвестрации атмосферного CO_2 , наибольшей значимостью обладает NBP-пул, углерод которого отчуждается из биогеохимического цикла на сотни и даже тысячи лет. Поэтому сохранение и накопление в почвах углерода именно этого пула способствует уменьшению эмиссии CO_2 в атмосферу и, как следствие, снижению потенциала глобального потепления (ПГП) (WMO, 2019). Основная проблема секвестрации CO_2 , имеющая в настоящее время мировое значение, состоит в том, чтобы максимально увеличить поступление и накопление в почвах устойчивого к минерализации пула органического углерода.

Накопление органического углерода в наземном NEP-пуле (преимущественно древесная растительность) выводит CO_2 из атмосферы на период от нескольких лет до десятков и даже сотен лет и работает на снижение ПГП. Посадка лесов, залужение и зарастание бывших пахотных угодий (залежи) — наиболее распространенные пути секвестрации CO_2 . Однако накопление углерода в древесном пуле часто подвергается риску залповых выбросов CO_2 (пожары, массовые поражения вредителями и болезнями и другие катастрофические явления). Возвращение залежей в пахотные угодья также сопровождается быстрой потерей накопившегося органического углерода почвы.

Время пребывания $C_{\text{орг}}$ в почвенном NEP-пуле также недолговечно, поскольку он представлен легко минерализуемыми органическими соединениями, формирующимися из наземных и подземных растительных остатков (корней), биомассы почвенной биоты, органических удобрений, сидератов, покровных и парозанимающих культур. В процессе гумусообразования сравнительно небольшая часть углерода переходит в разряд трудно минерализуемых и негидролизуемых гумусовых веществ и пополняет NBP-пул, углерод которого является показателем долговременной секвестрации.

В литературе широко освещаются приемы секвестрации органического углерода, заключающиеся в обогащении почв органическим углеродом при использовании различных материалов (на-

воз, компосты, биоуголь и др.), а также приемы земледелия, способствующие как большему поступлению в почву растительных остатков, так и созданию условий замедления их минерализации, например минимальная обработка почв — NT (no till) (Кирюшин В., Кирюшин С., 2015; Рижия и др., 2015; Дубровина, 2021; Buchkina et al., 2013; Ding et al., 2013; Berhane et al., 2020; Wang et al., 2020; Waqas et al., 2020; Li et al., 2021; Mustafa et al., 2021). Выращивание покровных культур, сидератов или смена вида землепользования (залесение, залужение и др.) также способствуют секвестрации органического углерода. Перечисленные мероприятия имеют свои особенности и не всегда при строгом рассмотрении подходят под определение “секвестрация”.

Оценка секвестрации углерода в почвах может быть установлена по отношению гетеротрофного дыхания почв к накоплению в ней органического углерода (Tian J. et al., 2015). Увеличение содержания органического углерода в почве без учета как затрат углерода NPP-пула на это повышение, так и потерь углерода за счет эмиссии CO_2 , нельзя считать секвестрацией.

ВИДЫ СЕКВЕСТРАЦИИ УГЛЕРОДА В ПОЧВАХ

В данном разделе приводятся примеры различных путей секвестрации углерода в почвах.

Применение навоза

Применение навоза в земледелии известно издревле как способ пополнения питательными веществами почв. Преимущество навоза перед другими видами удобрений состоит в том, что он является медленно действующим и не создает единовременно высоких концентраций легкоподвижных соединений, прежде всего нитрат- и аммоний-содержащих солей. Следовательно, положительное последствие навоза растягивается на годы.

На первый взгляд, внесение в почву навоза должно приводить к секвестрации органического углерода. Действительно, систематическое применение навоза приводит к накоплению в почвах органического углерода (Городний, 1960; Горшков, 1960; Любарская, 1960; Соболев, Чернецкий, 1960; Шевелев, 1960; Шевцова, 1988; Хлыстовский, 1992; Rothamsted research, 2006).

В настоящее время, когда остро ставится вопрос о низкоуглеродном развитии мирового сельскохозяйственного производства, накопленные в прошлом многолетние данные по изучению эффективности применения органических удобрений приобретают новую актуальность. Изначальная цель этих опытов — сравнение эффективности органических и минеральных удобрений через выявление воздействия этих удобрений на агрохимические свойства почв, включая гумус, а

Таблица 1. Баланс* $C_{орг}$ в почве (гор. 0–20 см) за 44 года в опытах ДАОС НИУИФ

Варианты	Исходное содержание в почве	Внесено с удобрениями	Поступление*** с наземными и корневыми остатками	Всего: исходное + поступление	Содержание в почве через 44 года	Потери $C_{орг}$ за 44 года		
						всего	т/га/год	
$C_{орг}$, т/га								
Контроль	31.8	0	46.2	78.0	21.3	56.7	1.29	
Навоз	31.8	40.5**	74.6	146.9	27.0	119.9	2.73	
Разность	0	40.5	28.4	68.9	5.7	63.2	1.44	

Примечание: * – представленные в таблице данные рассчитаны по результатам 6 полевых опытов из монографии (Хлыстовский, 1992). В баланс не были включены данные по утилизируемой продукции (зерно, клубни, корнеплоды свеклы, зеленая масса клевера, солома, которые вывозились с поля). Утилизируемая продукция представляла собой лишь часть NPP; ** – навоз содержал 20% сухого органического вещества. При переводе в $C_{орг}$ использовался коэффициент 0.45; *** – о судьбе части NPP, представляющей собой наземные растительные остатки и корни, сведений в книге нет. Мы восполнили этот пробел расчетными данными, выполненными на основе соответствующих коэффициентов продукции по методике Почвенного института им. В.В. Докучаева (Семенов, Когут, 2015).

также на содержание азота, фосфора, калия, кальция и др. Однако, чтобы определить, насколько возможна секвестрация органического углерода и каковы ее размеры при удобрении навозом, обратимся к данным многолетних опытов, проведенных в различных почвенно-климатических условиях, и проанализируем состояние баланса углерода в системе органические удобрения–почва–растения–атмосфера.

Материалы полевых опытов Долгопрудной агрохимической опытной станции Научно-исследовательского института по удобрениям и инсекто-фунгицидам им. Я.В. Самойлова (ДАОС НИУИФ) по сравнительному действию навоза и эквивалентной смеси минеральных удобрений представлены в книге (Хлыстовский, 1992). Опыты были заложены по инициативе акад. Д.Н. Прянишникова на дерново-подзолистой тяжелосуглинистой почве в нескольких севооборотах с набором культур: озимая рожь (пшеница), картофель, овес, пар клеверный на фоне известкования и без него. Ротация севооборота проходила на четырех полях. Это многофакторное исследование, в котором были оценены факторы: 1) удобрения: контроль – без удобрений; навоз, минеральные удобрения, то есть смесь NPK, эквивалентная количеству, вносимому с навозом; 2) влияние известкования почвы на эффективность удобрений; 3) севооборот, то есть чередование культур. Кроме того, в схеме опыта было предусмотрено определение сравнительной отзывчивости каждой культуры севооборота на удобрения и известкование. Для этого было предусмотрено ежегодное развертывание опыта на четырех полях севооборота. То есть опыт был развернут в пространстве и во времени. Результаты эксперимента учитывались и обрабатывались ежегодно по всем культурам севооборота. Для целей настоящего обзора были обработаны результаты двух вариантов опыта: контроль и навоз одиннадцати ротаций севооборота за 44 года. За каждую рота-

цию вносили 36 т навоза/га, или в среднем 9 т навоза/га/год.

Прежде всего, необходимо отметить, что на протяжении всего времени опыта отмечено достоверное снижение содержания органических углерода и азота в почве не только на контроле, но и при внесении удобрений. Содержание органического вещества в почве при внесении навоза тоже сократилось, но в меньшей степени, чем на контроле и при внесении минеральных удобрений. Отношение C : N в гумусе почвы оставалось практически неизменным, и длительное внесение удобрений не сказалось на этом показателе (рис. 2). Это свидетельствует о синхронном высвобождении CO_2 и минерального азота при минерализации гумуса.

В табл. 1 приведен примерный баланс органического углерода за 44 года, составленный нами на основе данных четырех полевых опытов (Хлыстовский, 1992), позволивший судить о возможной секвестрации углерода среднесрочного типа. Потери органического углерода из почвы – ничто иное как гетеротрофное дыхание и эмиссия CO_2 в атмосферу. При внесении навоза, по сравнению с контролем, через 44 года потери $C_{орг}$ оказались равными 63.2 т, что превышало количество $C_{орг}$, внесенного с навозом.

Остаточный $C_{орг}$ в почве навозного варианта за все годы эксперимента оставался примерно на одном уровне (рис. 3а). Данные показывают, что со временем при внесении каждой новой порции навоза минерализация и суммарные потери $C_{орг}$ увеличивались (рис. 3б). Этот факт свидетельствует о продолжавшемся процессе гумификации, о минерализации и о потерях ранее внесенного $C_{орг}$. Кроме того, вновь поступавший в почву легко минерализуемый $C_{орг}$ мог вызвать затравочный эффект и усилить минерализацию $C_{орг}$ (Tian J. et al., 2015; Wang et al., 2020).

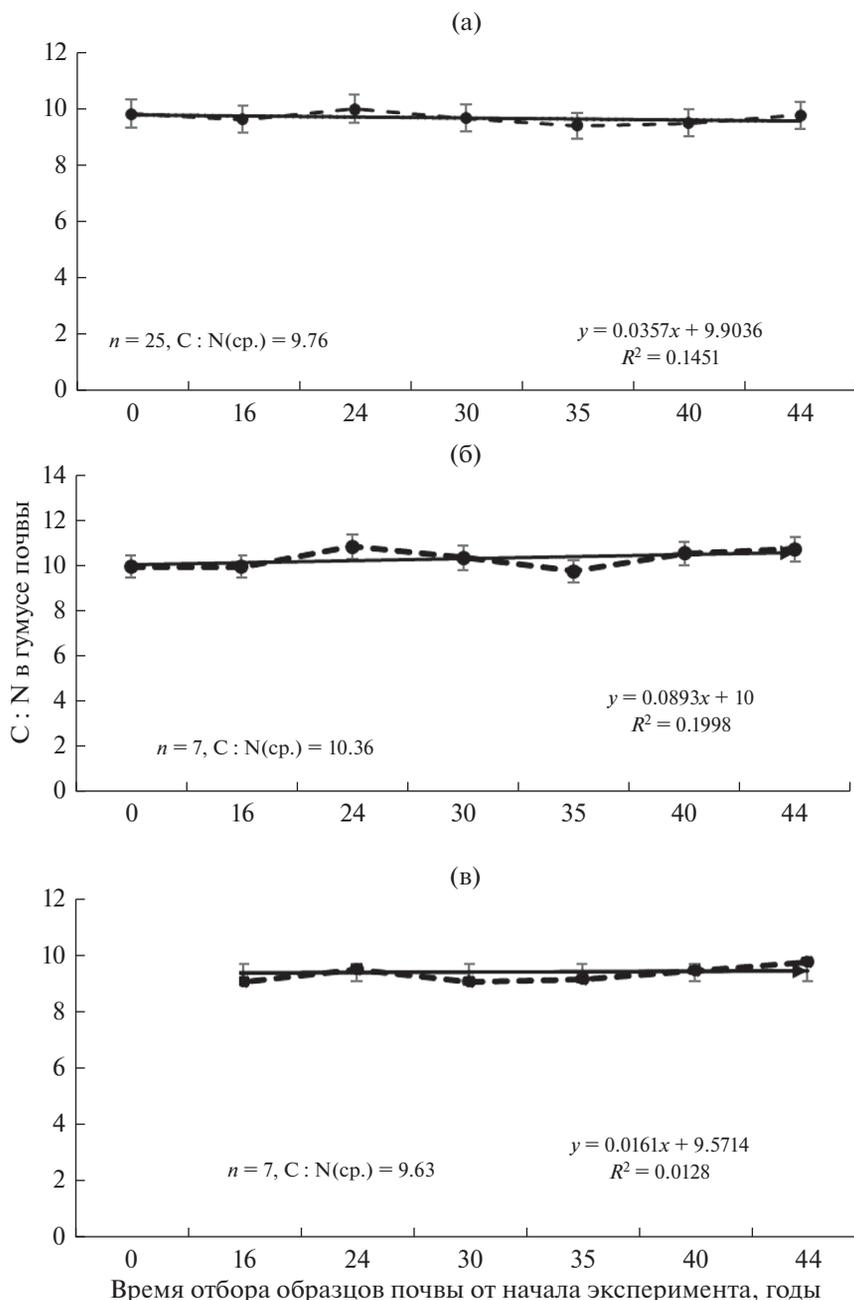


Рис. 2. Влияние органических (навоз) и минеральных удобрений на отношение C : N в гумусе дерново-подзолистой почвы многолетних опытов ДАОС НИУИФ (Хлыстовский, 1992). (а) – контроль без удобрений, (б) – внесение навоза, (в) – смесь минеральных удобрений (N, P, K, Ca); n – выборка данных.

Таким образом, за весь период проведения опыта внесение навоза не только не способствовало секвестрации углерода, а даже наоборот усилило мобилизацию почвенного $C_{\text{орг}}$ и его потери.

Данные (Хлыстовский, 1992) по продуктивности всех сельскохозяйственных культур в опытах за все годы, выраженные в зерновых единицах (з. е.), позволили рассчитать углеродный след полученной земледельческой продукции. Продуктивность в з. е. за 44-летний период составила в среднем

(ц/га/год): контроль (без удобрений) – 14.2, по навозу – 24.5. Деление потерь органического углерода почвы (т С/га) на з. е., выраженные также в т/га, дает величину затрат $C_{\text{орг}}$ на единицу полученной продукции. Расчеты показывают, что углеродный след на контроле оказался равным 0.9 т $C_{\text{орг}}$ /т зерна, а при применении навоза – 1.1 т $C_{\text{орг}}$ /т зерна.

Однако показанные выше затраты углерода на полученные урожаи – далеко не полные. Не учте-

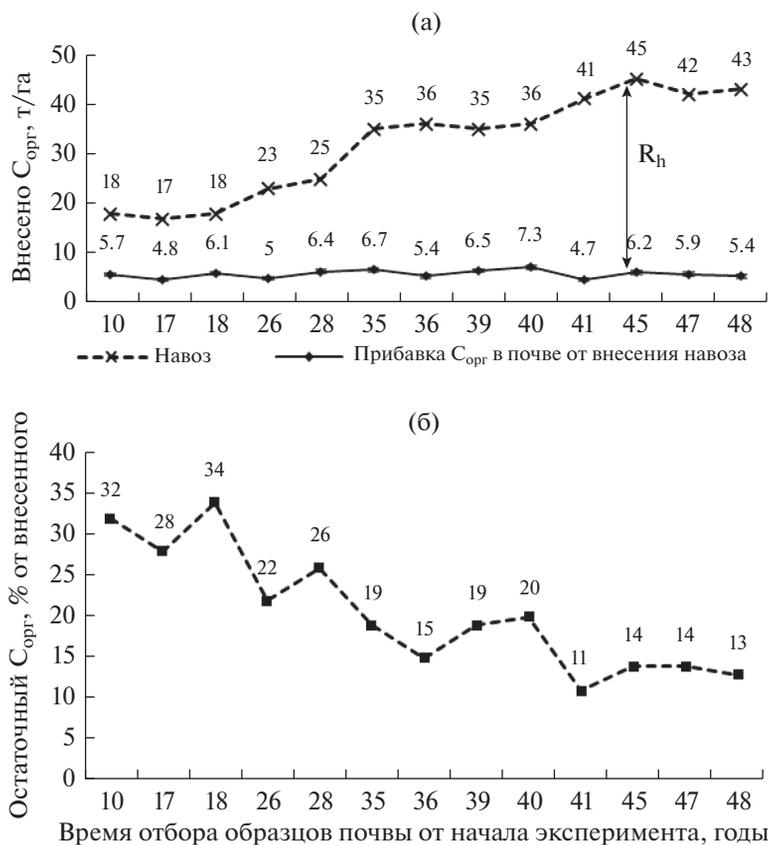


Рис. 3. Влияние длительного внесения навоза на содержание остаточного $C_{орг}$ в почве в полевых опытах ДАОС НИУИФ. Графики построены на основе данных (Хлыстовский, 1992, стр. 51, табл. 38). (а) – внесенное количество навоза и прибавка $C_{орг}$ в почве, т/га; R_h – потери $C_{орг}$ (гетеротрофное дыхание); (б) – динамика содержания остаточного $C_{орг}$ в почве в % от внесенного (гумификация).

ны энергетические затраты в углеродных единицах на обработку почвы, посев и уборку урожая. Должны быть учтены и затраты углерода кормов (NPP и NEP), участвующих в формировании экскрементов животных, и связанная с этим процессом эмиссия газов (CO_2 , CH_4), а также углерод использованной подстилки. Следует полагать, что затраты углерода на получение зерновой единицы основной продукции при удобрении навозом с учетом всех составляющих баланса будут значительно превосходить те, что приведены выше.

Результаты опыта на темно-серой слабоподзоленной легкосуглинистой почве в Сумской обл., проводившегося в 1931–1957 гг. (Городний, 1960), позволили рассчитать секвестрацию углерода навоза при его внесении в количествах 380, 640 и 1280 т/га за 27 лет. Потери углерода навоза на секвестрацию 1 т $C_{орг}$ /га в почве в зависимости от доз удобрения оказались в пределах 3.36–7.27 т С/га. Чем выше доза внесенной в почву органики, тем “дороже” единица секвестрируемого углерода. Как и в Прянишниковском опыте, повышение количества вносимого навоза увеличивало относительный уровень потерь углерода за счет эмиссии CO_2 .

На слабо выщелоченном черноземе данные многолетнего опыта (Горшков, 1960) позволили рассчитать секвестрацию углерода навоза, вносимого в четырехпольном севообороте. По прошествии 12 лет в почву было внесено 120 т/га навоза в 4 приема, что соответствовало 11.9 т $C_{орг}$ /га/год. В почве (гор. 0–20 см) прирост гумуса за 12 лет оказался равным 3.3 т $C_{орг}$ /га. Потери же составили 8.6 т $C_{орг}$ /га или 72% от его количества, внесенного с навозом. Потери $C_{орг}$ на 1 т/га секвестрированного углерода составили 3.6 т $C_{орг}$ /га.

В другом опыте тоже на слабовыщелоченном легкосуглинистом черноземе (Соболев, Чернецкий, 1960) результаты 20-летнего внесения органики позволили показать, что из 37.1 т $C_{орг}$ /га потери углерода навоза из почвы составили 28.8 т/га. Затраты углерода навоза на 1 т секвестрированного $C_{орг}$ в почве оказались почти такими же (3.5 т/га), как и в опыте, упомянутом выше.

В опыте на высокогумусном черноземе Шатиловской опытной станции (Шевелев, 1960) за 45-летний период потери углерода навоза на 1 т секвестрированного углерода в почве колебались в пределах 17.8–1.6 т/га. Максимальная величина

Таблица 2. Примерный* баланс органического углерода в почве классического опыта с бессменной озимой пшеницей за 156** лет (Rothamsted research, 2006)

Варианты	Исходное содержание в почве (1)	Внесено с навозом *** (2)	$C_{\text{орг}}$, всего: (1) + (2) (3)	Содержание в почве $C_{\text{орг}}$ в 2000 г. (4)	Прибавка $C_{\text{орг}}$ в почве от внесения навоза (секвестрация) по (4) (Н)–(К)	Потери $C_{\text{орг}}$, всего (3)–(4)	Секвестрация от внесенного в почву $C_{\text{орг}}$, %
$C_{\text{орг}}$, т/га							
Контроль (К)	35	0	35	34.5	нет	н/опр.	н/опр.
Навоз (Н)	35	470	505	96.6	62.1	408.4	13.2

Примечание: * – в расчеты баланса углерода не вошли данные по количеству углерода в наземных и подземных (корни) растительных остатках. $C_{\text{орг}}$ вычислялся косвенно по содержанию общего азота и отношению C : N = 10 (Rothamsted research, 2006); ** – в 1920–1930-х гг. навоз не вносился (около 20 лет); *** – принято, что сухое вещество навоза составляет 20%. Для пересчета в $C_{\text{орг}}$ использовался коэффициент 0.45. В 35 т/га навоза содержание $C_{\text{орг}}$ – 3.15 т/га.

соответствовала внесению дозы навоза – 36.0 т/га в 9 лет, а минимальная – 36 т/га в 3 года. Этот факт свидетельствует о постоянно продолжавшейся и увеличивавшейся суммарной минерализации $C_{\text{орг}}$ навоза во времени.

Весьма интересны результаты полевого опыта с самым длительным применением навоза. Это классический опыт, проводимый в Англии на Ротамстедской опытной станции “Broadbalk winter wheat experiment”. Опыт заложен в 1843 г. на тяжелосуглинистой карбонатной почве. Смесь минеральных удобрений (N, P, K, Na, Mg) сравнивалась с навозом, который вносили в дозе 35 т/га/год. В цитируемой работе (Rothamsted research, 2006) приведены данные опыта до 2000 г. Все годы уровень урожая зерна озимой пшеницы по навозному варианту и смеси N, P, K, Na, Mg, включающей дозу азота 144 кг/га, были практически одинаковыми и синхронно повышались при нововведениях в качестве общего фона: новые сорта, парование, применение гербицидов, известкование, фунгициды. В первые 80 лет урожаи зерна на навозном и минеральном вариантах оставались в пределах 2.5–3.0 т/га, а на контроле (без удобрений) были около 1 т/га. Заметный рост урожая начался с момента известкования и применения гербицидов (1960-е гг.), а с середины 1960-х гг. при введении интенсивных сортов пшеницы и фунгицидов рост урожая приобрел экспоненциальный характер и достиг 10 т/га. На контроле без удобрений при тех же нововведениях урожай оставался на уровне 1.0–1.5 т/га.

На основе данных (Rothamsted research, 2006) нами составлен приблизительный баланс органического углерода за время проведения эксперимента до 2000 г. (табл. 2). Почти полуторавековое внесение навоза способствовало увеличению содержания $C_{\text{орг}}$ в почве, по сравнению с контролем, в 2.8 раза. Однако потери органического углерода из почвы в варианте с навозом составляли почти 90% от количества $C_{\text{орг}}$, внесенного с навозом. Потери $C_{\text{орг}}$ – это ничто иное как гетеротроф-

ное дыхание с последующей эмиссией CO_2 в атмосферу.

Доля секвестрации углерода от внесенного количества навоза, вычисленная нами по результатам опыта за 156 лет, составила 13.2%. Эта величина характерна и для других почвенно-климатических условий и органических удобрений и представляет собой коэффициент гумификации.

По другим европейским многолетним опытам с навозом, например опыт в Гале, Германия (Любарская, 1960), за 72-летний период внесения навоза на секвестрацию в почве 1 т $C_{\text{орг}}$ /га потери $C_{\text{орг}}$ навоза составили 13.4 т/га, то есть почти столько же, сколько в британских экспериментах.

В приведенных исследованиях показаны неполные затраты углерода. Не учтены величины углерода в NPP (в виде кормов для животных), затраченных при формировании экскрементов у животных, и количество углерода, эмитированного при этом в виде парниковых газов.

Таким образом, результаты экспериментов с многолетним применением навоза свидетельствуют о значительных потерях $C_{\text{орг}}$ навоза из почвы во всех без исключения случаях. При этом потери углерода делают баланс углерода в системе растение–навоз–почва–атмосфера отрицательным, что означает значительное превышение эмиссии CO_2 над накоплением в почве углерода NBP-пула. Применение навоза можно охарактеризовать как фактор, способствующий нарастанию ПГП.

Однако приведенные выше данные по отрицательному влиянию навоза на уровень секвестрации углерода в почве не должны восприниматься как факты, обосновывающие ограничение применения органических удобрений. Почва, образно выражаясь, является живым организмом, и ей свойствен дыхательный процесс, а дыхательным субстратом для почвенной микрофлоры являются легко минерализуемые органические вещества. Внесение в почву органических удобрений значительно повышает ее энергетический статус,

который способствует усилению соокисления и детоксикации множества загрязняющих почву веществ. Кроме того, внесение навоза пополняет в почве запасы легко усваиваемых питательных веществ для растений.

Компосты

Компосты широко применяются в качестве органических удобрений, и одновременно это способ утилизации различных бытовых, сельскохозяйственных и промышленных отходов. Компосты часто используются в качестве секвестра органического углерода. В большинстве работ мы видим, что под секвестрацией понимаем лишь накопление в почвах $C_{\text{орг}}$, независимо от продолжительности его пребывания в почве, а, главное, без учета складывающегося баланса между поступившим в почву $C_{\text{орг}}$ и эмиссией в атмосферу парниковых газов. Показано (Ding et al., 2013), что 18-летнее применение компоста не только увеличило содержание органического углерода в почве, но и увеличило эмиссию N_2O на 106%. Если принять во внимание, что ПГП закиси азота в 298 раз выше CO_2 , то оказывается, что эффект от секвестрации углерода с целью снижения ПГП почти полностью нивелируется дополнительными выбросами из почвы N_2O . Таким образом, обогащение почвы компостами не всегда благоприятствует сокращению выбросов парниковых газов в земледелии.

Солома и корневые остатки

Повышающиеся урожаи сельскохозяйственных культур при внедрении современных технологий способствуют увеличению поступления в почву пожнивных остатков и корневой массы, что приводит к увеличению секвестрации органического углерода в почвах (Fan et al., 2019). Размеры секвестрации $C_{\text{орг}}$ в почве при многократном возврате соломы зависят от ряда сопутствующих факторов и, прежде всего, сопутствующего внесения в почву минеральных удобрений, непременно включающих в себя азотные (Berhane et al., 2020). Это положение имеет под собой соответствующее обоснование. Внесение в почву органических материалов с широким отношением $C : N$ вызывает активизацию гетеротрофной микрофлоры с острой потребностью в усваиваемом азоте. Дефицит усваиваемого азота в почве приводит к интенсивному разложению соломы с потерей CO_2 . Показано (Berhane et al., 2020), что применение NPK (азот, фосфор, калий) и NPK + солома, а также NP и NP + солома оказались неравнозначны в накоплении в почве $C_{\text{орг}}$. Запасы $C_{\text{орг}}$ в почве при внесении NPK и NPK + солома увеличивались на протяжении более чем 20-летнего периода, при этом достижение максимальных запасов $C_{\text{орг}}$ в вариантах NP и NP + солома было ограничено периодом от 11 до 20 лет. В работе

показано, что в опытах, проведенных с многократным возвратом в почву соломы, накопление органического углерода было больше в почвах в том случае, когда к соломе добавляли минеральные удобрения с участием азота и фосфора. Добавление калия не имело преимуществ, поскольку солома сама значительно обогащена калием. Эти данные хорошо согласуются с нашими, полученными в 1990-х гг. на серой лесной почве (Кудряров, 1999).

Покровные культуры

Включение покровных культур в сельскохозяйственные севообороты может значительно увеличить почвенный $C_{\text{орг}}$. Однако получаемые результаты часто бывают противоречивы. Были собраны данные (Jian et al., 2020), в которых сравнивались системы земледелия с покровными культурами и без них. Проведено сравнение 1195 пар (покровная культура и беспокровная) в 131 эксперименте. Покровные культуры —рожь *Secale cereale* и однолетний райграс *Lolium multiflorum*. Использовались также бобовые культуры.

Большее половины (60%) данных представлено из США. Результаты сгруппированы по почвам с разным гранулометрическим составом. Так, на легких почвах включение покровных культур в севообороты значительно повышало $C_{\text{орг}}$, с общим средним увеличением на 15.5% (13.8–17.3%), по сравнению с вариантами беспокровной культуры.

Наибольший сток $C_{\text{орг}}$ был отмечен для покровных культур в севообороте кукуруза—пшеница—соя. На среднесуглинистой почве сток $C_{\text{орг}}$ на покровном варианте был на 2 т $C_{\text{орг}}$ /га выше, чем на беспокровном. Тяжелые почвы показали наибольший прирост $C_{\text{орг}}$ после включения покровных культур в севооборот.

Смеси покровных культур приводили к большему увеличению $C_{\text{орг}}$, по сравнению с моновидами покровными культурами, а использование бобовых вызвало большее увеличение $C_{\text{орг}}$, чем небобовых.

Покровное земледелие значительно увеличивает $C_{\text{орг}}$ на неглубоких почвах (≤ 30 см), по сравнению с подповерхностными горизонтами (> 30 см). Регрессионный анализ показал, что изменения $C_{\text{орг}}$ в результате покровного земледелия коррелируют с улучшением качества почвы, в частности с уменьшением эрозии и увеличением содержания минерализуемого органического вещества. На изменение углерода в почве также влияли годовая температура, количество лет после начала введения в севооборот покровных культур, географическая широта и первоначальное содержание $C_{\text{орг}}$. Наконец, полученная средняя величина связывания углерода покровными культурами во всех исследованиях составила 0.56 т C/га/год. Авторы (Jian et al., 2020) делают вывод: если бы на 15% нынешних мировых пахотных землях внедрились

покровные культуры, это привело бы к увеличению $C_{\text{орг}}$ на 0.16 ± 0.06 млн т С/год, что аналогично 1–2% текущих выбросов от сжигания ископаемого топлива.

Минимальная обработка почвы

В литературе широко обсуждаются результаты внедрения минимальной обработки NT в земледелие, в частности, данные относительно секвестрации углерода в почвах (Sperow, 2019; Cooper et al., 2021; Jia et al., 2021; Reinsch et al., 2021; Kan et al., 2021, 2022; Dewi et al., 2022). Минимальная (беспашотная) обработка почвы часто рекомендуется для уменьшения минерализации органического вещества как поверхностных растительных остатков, так и почвенного $C_{\text{орг}}$. Считается, что такая обработка почвы способствует секвестрации атмосферной углекислоты.

Темпы накопления и минерализации $C_{\text{орг}}$ в почве значительно зависят от времени, прошедшего с момента введения NT. Авторы (Kan et al., 2021) попытались установить основные факторы накопления стабильных фракций $C_{\text{орг}}$ ($\text{СФС}_{\text{орг}}$) в почве в 11-летнем полевом опыте. Полевой эксперимент показал, что, по сравнению с плужной обработкой почвы (ПО), в NT-почве доля более стабильных фракций почвенного $C_{\text{орг}}$ оказалась выше. Увеличение концентрации $\text{СФС}_{\text{орг}}$ повысилось на 12.6% на пятом году полевого эксперимента, а на одиннадцатом году – уже на 52.2%. Авторы объясняют такие результаты изменение агрегатного состава почв: фракция макроагрегатов размером 2 мм, в которых органическое вещество физически защищено, увеличивается, что способствует меньшей его минерализации.

В другой работе (Kan et al., 2022) механизмы стабилизации почвенного органического углерода изучены в их связи с глобальным углеродным циклом. NT часто используется для секвестра $C_{\text{орг}}$. Однако высказываются сомнения (Kan et al., 2021), будет ли секвестрированный $C_{\text{орг}}$ стабилизирован в долгосрочной перспективе. Авторы рассмотрели различные механизмы, влияющие на стабильность $C_{\text{орг}}$ в системах NT: прайминг-эффект PE (priming effect) (Tian J. et al., 2015; Wang et al., 2020); молекулярную структуру $C_{\text{орг}}$; защиту агрегатов; связь с почвенными минералами; микробные свойства; воздействие на окружающую среду. Хотя при NT наблюдается более устойчивая молекулярная структура $C_{\text{орг}}$, по сравнению с традиционной обработкой почвы (ТО), стабильность $C_{\text{орг}}$ может в более продолжительном времени зависеть от физической и химической защиты. В среднем NT улучшает макроагрегацию на 32.7% и снижает минерализацию $C_{\text{орг}}$ в макроагрегатах, по сравнению с ТО. Более высокая микробная активность при NT может также детерминировать усиленное производство связывающих агентов, способствующих агрегации и образованию ме-

таллоорганических комплексов. Сделан вывод о том, что $C_{\text{орг}}$, изолированный в системах NT, вероятно, будет стабилизирован в долгосрочной перспективе.

Показано (Jia et al., 2021) также преимущество NT в секвестрации углерода в почвах, которое связано с более благоприятным водно-температурным режимом, по сравнению с пашенной почвой. NT способствует изменению почвенного профиля в результате накопления в верхних горизонтах большего количества растительных остатков и формирования горизонта A_0 . Это, в свою очередь, уменьшает поверхностное испарение и увеличивает запасы влаги в почвенном профиле, а также снижает температуру почвы.

Показано, что NT вызывает увеличение численности денитрифицирующих микроорганизмов (Doran, 1980). Комбинация NT и применения азотных удобрений приводит к усилению потерь газообразного азота. Обнаружены (Palma et al., 1997) в два раза большие потери азота удобрений за счет денитрификации при NT, по сравнению с нормальной пахотой за 90-дневный период. При этом установлена весьма тесная положительная связь между количеством денитрифицирующих микроорганизмов и газообразными потерями азота.

И наконец, в статье “Пахать или не пахать в условиях умеренного климата” (Cooper et al., 2021) оценено влияние NT в течение 15 лет на секвестрацию углерода и выбросы парниковых газов. Было показано, что рассчитанный ПГП оказался на 30% ниже в NT-системах за счет более низкой эмиссии CO_2 и соответствующей секвестрации углерода в почве. Сделано заключение, что NT играет важнейшую роль, с одной стороны, как способ снижения эмиссии парниковых газов, а с другой, – увеличивает секвестрацию углерода и тем самым способствует сохранению климата.

Однако в определенных условиях NT почвы может увеличить потоки закиси азота из почвы, что может свести на нет любые климатические выгоды потенциального хранения углерода в почве (Pelster et al., 2021). Чтобы исследовать, как длительное внесение различных органических удобрений взаимодействует с обработкой почвы и влияет на потоки N_2O в севообороте, с 2009 г. в Восточной Канаде проводились долгосрочные испытания. Сравнивались два типа обработки почвы: инверсионная обработка IT (inversion tillage) и NT – и два типа удобрений (свиной и коровий жидкий навоз – слари), при наличии контроля без удобрений по каждому типу обработки – IT и NT. Эксперимент заложен на двух контрастных по текстуре почвах: тяжелый и песчаный суглинки. Оценивались потоки N_2O с каждого участка посевов (апрель–ноябрь): в 2016 г. под пшеницей, в 2017 г. под кукурузой и в 2018 г. под соей. Средние кумулятивные потоки за вегетационный период варьировали: на тяжелосуглинистой почве от 0.8 кг N- N_2O /га для кукурузы (на контроле) до

7.6 кг N-N₂O/га для пшеницы (коровья навозная жижа) при NT-обработке; на песчаном суглинке – от 0.4 кг N-N₂O/га под кукурузой (контроль, IT) до 3.0 кг N-N₂O/га под кукурузой при внесении свиного слари по NT. В целом данные показали, что величина эмиссии N₂O при NT совместно с жидким навозом значительно превосходила эмиссию N₂O при обычной пахоте. При этом следует иметь в виду, что ПГП закиси азота в 298 раз выше углекислого газа. При пересчете на CO₂ максимальная эмиссия по NT-обработке составила 2265 кг/га.

Из этого следует, что на тяжелосуглинистой почве NT-обработка с применением органических удобрений не может рекомендоваться как способ борьбы с повышенной эмиссией парниковых газов.

Биоуголь (биочар)

Биоуголь, полученный из различных материалов, включая сельскохозяйственные отходы, используется в качестве мелиоративной добавки в почву. Рядом исследователей показано, что внесение в почву биоугля улучшает питательный и физический режимы почв, а также снижает эмиссию парниковых газов (CO₂, N₂O) (Рижия и др., 2011, 2015; Мухина и др., 2019; Дубровина, 2021).

Некоторые авторы рекомендуют применение биоугля в целях секвестрации углерода в почвах (Yang et al., 2019; Majumder et al., 2019; Ali et al., 2021; Oladele, Adetunji, 2021). Рассматриваются (Clark et al., 2019) результаты экспериментов с биоуглем, приготовленным из птичьего помета. Нетто-минерализация N в почве при краткосрочной инкубации была небольшая или даже отрицательная: 1.8 и –24.7 мг N/кг почвы для песчаной и суглинистой почв соответственно, что указывает на незначительную или нулевую новую минерализацию азота и углерода. Эти результаты свидетельствуют о возможном сохранении в почве углерода и азота биоугля в течение длительного времени.

Исследовался (Yang et al., 2019) NEE при добавлении биоугля (20 и 40 т/га) в условиях рисового поля. Обнаружено, что средний NEE рисового поля при внесении биоугля на 2.4 и 30.6% соответственно выше, чем на контроле. Добавление биоугля также увеличило C_{орг} за счет того, что растворенный органический углерод из отмершей микробной биомассы сорбировался биоуглем.

Проведен (Ali et al., 2021) двухлетний эксперимент с жемчужным просом на содово-засоленной почве. В этих исследованиях биоуголь добавляли в почву в пяти дозах: 0, 5, 10, 15 и 20 т/га. Биоуголь повысил уровень органического углерода в почве и улучшил доступность и поглощение N, P и K, по сравнению с контрольной почвой.

Однако в некоторых случаях внесение биоугля в почву может вызвать негативные последствия

для почвы и окружающей среды в целом (El-Naggar et al., 2019). Например, биоуголь может подавлять доступность питательных веществ в почве и снижать продуктивность сельскохозяйственных культур из-за сокращения поглощения питательных веществ растениями или уменьшения минерализации почвенного C_{орг}. Применение биоугля может также негативно повлиять на качество окружающей среды и здоровье человека из-за наличия вредных соединений, в частности полициклических ароматических углеводородов, полихлорированных дибензодиоксинов и дибензофуранов. Большие затраты энергии на получение биоугля также являются отрицательным фактором с позиции ПГП.

Смена вида землепользования

Перестройка производственных отношений в сельскохозяйственном секторе России привела к серьезным структурным изменениям аграрного землепользования. Из состава пахотных угодий за 25-летний период в залежное состояние перешло до 40 млн га. Пахотные угодья России за период 1992–2016 гг. представляли собой чистый источник C-CO₂ в размере 21–27 (в среднем 24.5) млн т C-CO₂/год (Кудеяров, 2019). Выведенные из сельскохозяйственного оборота десятки миллионов гектаров пахотных угодий перешли в разряд залежных земель, подвергшихся зарастанию луговой и древесной растительностью. Это, в свою очередь, изменило характер формирования биологической продуктивности и баланс углерода на сельскохозяйственных угодьях в целом. Исследование углеродного баланса залежей показало, что этот вид земель превратился из источника CO₂ в его абсолютный сток, то есть происходила секвестрация атмосферной CO₂. Так, средняя скорость депонирования углерода в бывших пахотных почвах РФ оценивается около 45 млн т C/год, а в целом за 1992–2016 гг. аккумулировалось около 1 млрд т углерода в органическом веществе почв и растительной биомассе выросшей за это время древесной и кустарниковой растительности (Баева и др., 2017; Kurganova et al., 2010, 2015).

Оценивая в целом изменение баланса углерода на землях сельскохозяйственного назначения за период 1992–2016 гг., можно констатировать, что в земледелии России сокращение пахотных угодий и перевод их в залежное состояние существенно изменили баланс углерода. Земледелие в целом из чистого источника C-CO₂ в начале 1990-х гг. превратилось в чистый накопитель (секвестор) C-CO₂. С позиций низкоуглеродного развития РФ можно рекомендовать сохранение залежи в составе сельскохозяйственных угодий как мощного накопителя углерода в сформировавшихся экосистемах.

Инициатива “4 промилле”

Увеличение запасов почвенного органического углерода в сельскохозяйственных почвах не только оказывает положительное влияние на качество почвы и устойчивость почвы, но также может способствовать смягчению последствий изменения климата. Инициатива “4 на 1000” (4 промилле), запущенная на Конференции ООН по изменению климата 2015 г. в Ле-Бурже, направлена на увеличение глобальных запасов $C_{\text{орг}}$ на глубине 0–40 см ежегодно на 4 части на тысячу, чтобы компенсировать увеличение антропогенных выбросов CO_2 .

Проанализирована (Wiesmeier et al., 2020) осуществимость этой цели для сельскохозяйственных почв в Баварии, Юго-Восточная Германия. Если общее количество органического углерода составляет 276 Гт, которое в настоящее время хранится в верхних 40 см сельскохозяйственных почв в Баварии (пахотные и лугопастбищные угодья), то количество 4 промилле соответствует ежегодному связыванию углерода C в размере 1.1 Гт. Анализ текущего управления почвой для конкретных участков позволил разработать пространственные сценарии связывания C , включая пять перспективных методов управления: покровное земледелие, улучшение севооборота, органическое земледелие, агролесоводство и преобразование пахотных земель в луга. Результаты показали, что цель 4/1000 – невыполнима для Баварии. Общий потенциал пяти методов секвестра C привел к увеличению на 0.3–0.4 Гт $C_{\text{орг}}$ /год, что соответствует примерно 1 части на тысячу частей (1/1000) нынешних запасов $C_{\text{орг}}$. Расширение площади покровных культур и агролесоводства определено в качестве наиболее перспективных вариантов увеличения $C_{\text{орг}}$ в сельскохозяйственных почвах. В этой ситуации в Баварии будут компенсированы только около 1.5% ежегодных выбросов парниковых газов. Но и этот результат можно считать важным вкладом в смягчение последствий изменения климата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В большинстве процитированных работ под термином “секвестрация углерода в почве” понимается накопление остаточного органического углерода в почве, чему могут способствовать некоторые приемы: внесение различных органических добавок (навоз, компосты, биоуголь и др.); выращивание покровных культур, сидератов; беспашенная система земледелия. Все перечисленные приемы имеют свои особенности и при строгом рассмотрении не всегда подходят под определение “секвестрация”.

Для оценки уровня секвестрации углерода в почвах необходимо определение баланса между эмиссией CO_2 из почвы (гетеротрофное дыхание) и величиной нового почвенного стока органиче-

ского углерода в форме NBP, то есть устойчивого к минерализации органического углерода. Сток углерода в NEP (легко минерализуемые формы углерода) определяет краткосрочную неустойчивую секвестрацию углерода. Переход органического углерода из NEP-пула в NBP-пул (иными словами, процесс гумификации) – длительный процесс, который сопровождается потерей углерода в результате гетеротрофного дыхания и эмиссии CO_2 в атмосферу.

Применение органических удобрений (прежде всего, навоза и различных компостов), являющихся чистой экосистемной продукцией, можно отнести к кратковременному типу секвестрации органического вещества. Затраты NPP и NEP (т C /га) на 1 т C /га в NBP-пуле могут колебаться от нескольких до десятков тонн C /га в зависимости от продолжительности и доз внесения органического удобрения в почву. Затраты NPP и NEP на образование NBP представляют собой потери углерода в результате дыхания почвенной биоты и эмиссии CO_2 в атмосферу. Следовательно, применение органических удобрений не обеспечивает длительную секвестрацию углерода и не служит снижению ПГП. Однако от применения навоза нельзя отказываться, поскольку он ценен не только содержанием в нем питательных веществ, но и как дыхательный субстрат для огромного количества разнообразных микроорганизмов, выполняющих очистительную функцию в почве.

Весьма перспективным приемом секвестрации атмосферной CO_2 является введение севооборотов с посевом покровных культур. По результатам метаисследований (Jian et al., 2020), на большом количестве (около 2000) экспериментов сравнения показано: если бы на 15% нынешних мировых пахотных земель внедрили покровные культуры, это привело бы к увеличению $C_{\text{орг}}$ в почвах на 0.16 ± 0.06 млн т C /год, что аналогично 1–2% текущих выбросов от сжигания ископаемого топлива.

Перспективным приемом секвестрации органического углерода в почвах может служить минимальная обработка почвы. NT способствует изменению почвенного профиля в результате накопления в верхних горизонтах большего количества растительных остатков и формирования горизонта A_0 . Это, в свою очередь, уменьшает поверхностное испарение и увеличивает запасы влаги в почвенном профиле, а также снижает температуру почвы. Однако в определенных условиях NT увеличивает потоки закиси азота из почвы, что может свести на нет любые климатические выгоды потенциального хранения $C_{\text{орг}}$ в почве (Pelster et al., 2021). Комбинация минимальной обработки почвы и применения азотных удобрений может приводить к усилению эмиссии N_2O , поскольку в гумусовом горизонте из-за слабой аэрации создаются благоприятные условия для процесса денитрификации (Palma et al., 1997).

Биоуголь, полученный из различных материалов, включая сельскохозяйственные отходы, может использоваться в качестве мелиоративной добавки в почву, улучшающей питательный и физический режимы почв. Однако пока не сложилось однозначное мнение относительно использования биоугля в качестве секвестра углерода. Кроме того, значительные энергетические затраты на получение биоугля делают его применение проблематичным в целях снижения ПГП.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в соответствии с Госзаданием № 122040500037-6.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агрохимическая характеристика почв СССР. Т. 1. Северные районы Европейской части РСФСР / Ред. А.В. Соколов. М.: АН СССР, 1962. 280 с.
- Агрохимическая характеристика почв СССР. Т. 2. Районы Центрально-Чернозёмной полосы / Ред. А.В. Соколов. М.: АН СССР, 1963. 262 с.
- Агрохимическая характеристика почв СССР. Т. 3. Районы Северного Кавказа / Ред. А.В. Соколов. М.: Наука, 1964а. 365 с.
- Агрохимическая характеристика почв СССР. Т. 4. Районы Урала / Ред. А.В. Соколов. М.: Наука, 1964б. 328 с.
- Агрохимическая характеристика почв СССР. Т. 6. Районы Поволжья / Ред. А.В. Соколов. М.: Наука, 1966. 360 с.
- Агрохимическая характеристика почв СССР. Т. 9. Районы Западной Сибири / Ред. А.В. Соколов. М.: Наука, 1968. 383 с.
- Агрохимическая характеристика почв СССР. Т. 13. Центральные области нечерноземной зоны РСФСР / Ред. А.В. Соколов. М.: Наука, 1972. 272 с.
- Александрова Л.Н.* Органическое вещество почвы и процессы его трансформации. Л.: Наука, 1980. 287 с.
- Баева Ю.И., Курганова И.Н., Лопес де Гереню В.О., Телеснина В.М.* Содержание углерода в залежных почвах различных природно-климатических зон европейской части России // Ноосфера. 2017. № 1. С. 128–142.
- Городний Н.Г.* Действие различных доз и сочетаний навоза и минеральных удобрений в свекловичном севообороте // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов / Ред. П.Г. Найдин. М.: МСХ СССР, 1960. С. 86–125.
- Горшков П.А.* Результаты опытов по изучению системы удобрения свекловичного севооборота на слабо выщелоченном черноземе // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов / Ред. П.Г. Найдин. М.: МСХ СССР, 1960. С. 262–321.
- Демкин В.А.* Палеопочвоведение и археология: интеграция в изучении истории природы и общества. Пушкино: ПНЦ РАН, 1997. 213 с.
- Дубровина И.А.* Влияние биоугля на агрохимические показатели и ферментативную активность почв средней тайги Карелии // Почвоведение. 2021. № 12. С. 1523–1534.
- Иванов И.В., Табанакова Е.Г.* Изменение мощности гумусового горизонта и эволюция черноземов Восточной Европы в голоцене (механизмы, причины, закономерности) // Почвоведение. 2003. № 9. С. 1029–1042.
- Кирюшин В.И., Кирюшин С.В.* Агротехнологии. СПб: Лань, 2015. 463 с.
- Кононова М.М.* Органическое вещество почвы: его природа, свойства и методы изучения. М.: АН СССР, 1963. 314 с.
- Кудяров В.Н.* Азотно-углеродный баланс в почве // Почвоведение. 1999. № 1. С. 73–82.
- Кудяров В.Н.* Почвенно-биогеохимические аспекты состояния земледелия в Российской Федерации // Почвоведение. 2019. № 1. С. 109–121.
- Кудяров В.Н., Заварзин Г.А., Благодатский С.А. и др.* Пулы и потоки углерода в наземных экосистемах России. М.: Наука, 2007. 315 с.
- Любарская Л.С.* Влияние навоза и минеральных удобрений при длительном систематическом применении на урожай культур и плодородие почвы // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов / Ред. П.Г. Найдин. М.: МСХ СССР, 1960. С. 430–470.
- Мухина И.М., Рижия Е.Я., Бучкина Н.П.* Влияние биоугля на эмиссию закиси азота и эффективность использования удобрений // Мат. междунар. науч.-техн. конф. “Научно-технический прогресс в сельскохозяйственном производстве” (Минск, 17–18 октября 2019 г.). Минск: Беларуская навука, 2019. С. 150–154.
- Орлов Д.С., Бирюкова О.Н., Суханова Н.И.* Органическое вещество почв Российской Федерации. М.: Наука, 1996. 253 с.
- Рижия Е.Я., Бойцова Л.В., Бучкина Н.П., Панова Г.Г.* Влияние пожнивных остатков с различным отношением C/N на эмиссию закиси азота из дерново-подзолистой супесчаной почвы // Почвоведение. 2011. № 10. С. 1251–1259.
- Рижия Е.Я., Бучкина Н.П., Мухина И.М. и др.* Влияние биоугля на свойства образцов дерново-подзолистой супесчаной почвы с разной степенью окультуренности (лабораторный эксперимент) // Почвоведение. 2015. № 2. С. 211–220.
- Семенов В.М., Когут Б.М.* Почвенное органическое вещество. М.: ГЕОС, 2015. 233 с.
- Соболев Ф.С., Чернецкий А.И.* Действие различных доз и сочетаний навоза и минеральных удобрений в свекловичном севообороте // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов / Ред. П.Г. Найдин. М.: МСХ СССР, 1960. С. 126–143.

- Хлыстовский А.Д.* Плодородие почвы при длительном применении удобрений и известки. М.: Наука, 1992. 192 с.
- Шевелев М.П.* Обогащение почвы навозом и фосфатами в зерновом севообороте на выщелоченном черноземе // Влияние длительного применения удобрений на плодородие почвы и продуктивность севооборотов / Ред. П.Г. Найдин. М.: МСХ СССР, 1960. С. 144–168.
- Шевцова Л.К.* Гумусное состояние и азотный фонд основных типов почв при длительном применении удобрений: Автореф. дис... докт. биол. наук. М.: МГУ, 1988. 48 с.
- Ali E.F., Al-Yasi H.M., Kheir A.M.S., Eissa M.A.* Effect of biochar on CO₂ sequestration and productivity of pearl millet plants grown in saline sodic soils // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2021. V. 21. № 2. P. 897–907. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00409-z>
- Berhane M., Xu M., Liang Z.Y. et al.* Effects of long-term straw return on soil organic carbon storage and sequestration rate in North China upland crops: a meta-analysis // *Glob. Change Biol.* 2020. V. 26. № 4. P. 2686–2701. <https://doi.org/10.1111/gcb.15018>
- Buchkina N.P., Rizhiya E.Y., Pavlik S.V., Balashov E.V.* Soil physical properties and nitrous oxide emission from agricultural soils // *Advances in Agrophysical Research* / Eds S. Grundas, A. Stepniewski. L.: IntechOpen, 2013. P. 193–220.
- Clark M., Hastings M.G., Ryals R.* Soil carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils amended with manure-derived biochar // *J. Environ. Qual.* 2019. V. 48. № 3. P. 727–734. <https://doi.org/10.2134/jeq2018.10.0384>
- Cooper H.V., Sjögersten S., Lark R.M., Mooney S.J.* To till or not to till in a temperate ecosystem? Implications for climate change mitigation // *Environ. Res. Lett.* 2021. V. 16. P. 054022.
- Dewi R.K., Fukuda M., Takashima N. et al.* Soil carbon sequestration and soil quality change between no-tillage and conventional till soil management after 3 and 11 years of organic farming // *Soil Sci. Plant Nutr.* 2022. V. 68. № 1. P. 133–148. <https://doi.org/10.1080/00380768.2021.1997552>
- Ding W., Luo J., Li J. et al.* Effect of long-term compost and inorganic fertilizer application on background N₂O and fertilizer-induced N₂O emissions from an intensively cultivated soil // *Sci. Total Environ.* 2013. V. 465. P. 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.020>
- Doran J.W.* Soil microbial and biochemical changes associated with reduced tillage // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1980. V. 44. P. 765–771. <https://doi.org/10.2136/sssaj1980.03615995004400040022x>
- El-Naggar A., El-Naggar A.H., Shaheen S.M. et al.* Biochar composition-dependent impacts on soil nutrient release, carbon mineralization, potential environmental risk: a review // *J. Environ. Manag.* 2019. V. 241. P. 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.044>
- Fan J.L., McConkey B.G., Liang B.C. et al.* Increasing crop yields and root input make Canadian farmland a large carbon sink // *Geoderma.* 2019. V. 336. P. 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.08.004>
- Houlton B.Z., Morford S.L., Dahlgren R.A.* Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in earth's surface environment // *Science.* 2018. V. 360. P. 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.1257841>
- IPCC, 2013. Climate change: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change / Eds T.F. Stocker et al. N.Y.: Cambridge Univ. Press, 2013. 1535 p.
- Jia S.X., Liang A.Z., Zhang S.X. et al.* Effect of tillage system on soil CO₂ flux, soil microbial community and maize (*Zea mays* L.) yield // *Geoderma.* 2021. V. 384. P. 114813. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114813>
- Jian J.S., Du X., Reiter M.S., Stewart R.D.* A meta-analysis of global cropland soil carbon changes due to cover cropping // *Soil Biol. Biochem.* 2020. V. 143. P. 107735. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107735>
- Kan Z.R., Liu Q.Y., Virk A.L. et al.* Effects of experiment duration on carbon mineralization and accumulation under no-till // *Soil Till. Res.* 2021. V. 209. Art. 104939. <https://doi.org/10.1016/j.still.2021.104939>
- Kan Z.R., Liu W.X., Liu W.S. et al.* Mechanisms of soil organic carbon stability and its response to no-till: a global synthesis and perspective // *Glob. Chang. Biol.* 2022. V. 28. № 3. P. 693–710. <https://doi.org/10.1111/gcb.15968>
- Kowalenko G.G., Cameron D.R.* Nitrogen transformation in soil plant system in three years of field experiments using tracer and non-tracer methods on an ammonium-fixing soil // *Canad. J. Soil. Sci.* 1978. V. 58. № 2. P. 195–208.
- Kudeyarov V.N.* Mobility of fixed ammonium in soils. Terrestrial nitrogen cycles // *Ecol. Bull.* 1981. № 33. P. 281–286.
- Kurganova I.N.* Carbon dioxide emission from soils of Russian terrestrial ecosystems: interim report, IR-02–070. Laxenburg, Austria: IIASA, 2003. P. 02–070.
- Kurganova I.N., Kudeyarov V.N., Lopes de Gerenyu V.O.* Updated estimate of carbon balance on Russian territory // *Tellus B: Chem. Phys. Meteorol.* 2010. V. 62. № 5. P. 497–505. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0889.2010.00467.x>
- Kurganova I., Lopes de Gerenyu V., Kuzyakov Y.* Large-scale carbon sequestration in post-agrogenic ecosystems in Russia and Kazakhstan // *Catena.* 2015. V. 133. P. 461–466.
- Li X.S., Zhu W.L., Xu F.Y. et al.* Organic amendments affect soil organic carbon sequestration and fractions in fields with long-term contrasting nitrogen applications // *Agricult. Ecosyst. Environ.* 2021. V. 322. P. 107643. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107643>
- Majumder S., Neogi S., Dutta T. et al.* The impact of biochar on soil carbon sequestration: meta-analytical approach to evaluating environmental and economic advantages // *J. Environ. Manag.* 2019. V. 250. Art. 109466. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109466>
- Mellilo J.M., Prentice I.E., Farquhar G.D. et al.* Terrestrial biotic responses to environmental change and feedbacks to climate // *Climate change 1995. Impacts, adaptations and mitigation of climate change: scientific-technical analyses* / Eds R.T. Watson, M.C. Zinyowera, R.H. Moss. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1995. P. 445–481.
- Morford S.L., Houlton B.Z., Dahlgren R.A.* Direct quantification of long-term rock nitrogen inputs to temperate forest ecosystems // *Ecology.* 2016. V. 97 (1). P. 54–64.
- Mustafa A., Hu X., Shah S.A. et al.* Long-term fertilization alters chemical composition and stability of aggregate-associated organic carbon in a Chinese red soil: evidence from aggregate fractionation, C mineralization, and ¹³C NMR analyses // *J. Soil. Sediments.* 2021. V. 21. № 7. <https://doi.org/10.1007/s11368-021-03444-4>

- P. 2483–2496.
<https://doi.org/10.1007/s11368-021-02944-9>
- Oladele S.O., Adetunji A.T.* Agro-residue biochar and N fertilizer addition mitigates CO₂-C emission and stabilized organic carbon pools in a rain-fed agricultural cropland // *Int. Soil Water Conserv. Res.* 2021. V. 9. № 1. P. 76–86.
<https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2020.09.002>
- Palma R.M., Rímolo M., Saubidet M.I., Conti M.E.* Influence of tillage system on denitrification in maize-cropped soils // *Biol. Fertil. Soils.* 1997. V. 25. № 2. P. 142–146.
<https://doi.org/10.1007/s003740050294>
- Pelster D.E., Chantigny M.H., Royer I. et al.* Reduced tillage increased growing season N₂O emissions from a fine but not a coarse textured soil under the cool, humid climate of eastern Canada // *Soil Till. Res.* 2021. V. 206. Art. 104833.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104833>
- Reinsch T., Struck I.J.A., Loges R. et al.* Soil carbon dynamics of no-till silage maize in ley systems // *Soil Till. Res.* 2021. V. 209. Art. 104957.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2021.104957>
- Rothamsted research: guide to the classical and other long-term experiments, datasets and sample archive. Harpenden Herts, UK: Lawes Agricultural Trust Co. Ltd, 2006 (reprinted 2012). 52 p.
- Soon Y.K.* Nitrogen cycling involving non-exchangeable ammonium in gray luvisol // *Biol. Fertil. Soils.* 1998. V. 27. P. 425–429.
- Sperow M.* Marginal cost to increase soil organic carbon using no-till on U.S. cropland // *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change.* 2019. V. 24. № 1. P. 93–112.
<https://doi.org/10.1007/s11027-018-9799-7>
- Tarnocai C., Canadell J.D., Schuur E.A.G. et al.* Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region // *Global Biogeochem. Cycles.* 2009. V. 23. P. GB2023.
<https://doi.org/10.1029/2008GB003327>
- Tian H., Lu C., Yang J. et al.* Global patterns and controls of soil organic carbon dynamics as simulated by multiple terrestrial biosphere models: current status and future directions // *Glob. Biogeochem. Cycl.* 2015. V. 29. № 6. P. 775–792.
<https://doi.org/10.1002/2014gb005021>
- Tian J., Pausch J., Yu G. et al.* Aggregate size and their disruption affect ¹⁴C-labeled glucose mineralization and priming effect // *Appl. Soil Ecol.* 2015. V. 90. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.01.014>
- Wang Y.M., Li M., Jiang C.Y. et al.* Soil microbiome-induced changes in the priming effects of ¹³C-labelled substrates from rice residues // *Sci. Tot. Environ.* 2020. V. 726. Art. 138562.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138562>
- Waqas M.A., Li Y., Lal R. et al.* When does nutrient management sequester more carbon in soils and produce high and stable grain yields in China? // *Land Degrad. Devel.* 2020. V. 31. P. 1926–1941.
<https://doi.org/10.1002/ldr.3567>
- Wiesmeier M., Mayer S., Burmeister J. et al.* Feasibility of the 4 per 1000 initiative in Bavaria: a reality check of agricultural soil management and carbon sequestration scenarios // *Geoderma.* 2020. V. 369. P. 114333.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114333>
- WMO greenhouse gas bulletin: the state of greenhouse gases in the atmosphere based on global observations through 2018. № 15. 2019. 8 p.
- Yang S., Sun X., Ding J. et al.* Effects of biochar addition on the NEE and soil organic carbon content of paddy fields under water-saving irrigation // *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* 2019. V. 26. № 8. P. 8303–8311.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04326-8>
- Yevdokimov I.V., Blagodatsky S.A.* Nitrogen immobilization and remineralization by microorganisms and nitrogen uptake by plants: interactions and rate calculations // *Geomicrobiol. J.* 1993. V. 11. № 3–4. P. 185–193.
<https://doi.org/10.1080/01490459309377950>

Soil Carbon Sequestration: Facts and Challenges (Analytical Review)

V. N. Kudyarov^{a, b, *}

^a*Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science,
 Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research,
 Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia*

^b*Institute of Phytopathology, Russian Academy of Sciences,
 Bolshiye Vyazemy, Moscow Region, Russia*

*e-mail: vnikolaevich2001@mail.ru

The presented work is devoted to the assessment of carbon sequestration depending on the methods of enrichment the soil with organic materials. The level of additional sequestration in soils must be determined by taking into account the costs of net primary (NPP) and ecosystem (NEP) production of photosynthesis by the amount of the new additions of the mineralization-resistant organic carbon—net biome production (NBP). Carbon stock into easily mineralizable forms of NEP determines the short-term sequestration of carbon. Medium- and long-term sequestration is the accumulation of carbon in the soil in the NBP pool. The transformation of organic carbon in the system of NPP→NEP→NBP pools is a long process of humification and is accompanied by a loss of carbon (CO₂) into the atmosphere.

Keywords: soil, carbon sequestration, carbon cycles, carbon balance, organic fertilizers, soil respiration

УДК 581.524:556.56:551:583

БОЛОТА И АНТРОПОГЕННО-ИЗМЕНЕННЫЕ ТОРФЯНИКИ: УГЛЕРОД, ПАРНИКОВЫЕ ГАЗЫ, ИЗМЕНЕНИЕ КЛИМАТА

© 2022 г. А. А. Сирин*

Институт лесоведения РАН, с. Успенское, Московская обл., Россия

*e-mail: sirin@ilan.ras.ru

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 22.09.2022 г.

Принята к публикации 22.09.2022 г.

Болота играют особую роль в накоплении углерода, формировании газового состава атмосферы и влиянии на климат. Рассмотрены особенности болотных экосистем, их распространение, разнообразие и современное состояние, реакция на изменение климата, их роль в качестве резервуара углерода, источника и поглотителя парниковых газов и изменение этой роли при воздействии человека. Показаны возможности сокращения выбросов парниковых газов из антропогенно-измененных торфяников, эффективность их обводнения и восстановления болот для смягчения изменения климата, адаптации к изменению климата и обеспечения устойчивости.

Ключевые слова: болота, торфяники, изменение климата, углерод, смягчение, адаптация, парниковые газы

DOI: 10.31857/S0042132422060096

ВВЕДЕНИЕ

Потепление климата принимает все более критические масштабы (IPCC, 2021), наиболее остро проявляясь в высоких широтах и оказывая разную степень воздействия на всей территории России (Второй оценочный..., 2014). Изменение температур сопровождается различными изменениями количества атмосферных осадков в регионах. Усиливается несбалансированность климата, растет статистика экстремальных явлений (сильная жара/холод, засуха, ливни, ураганы и пр.). Помимо прямого влияния, экстремумы способствуют возникновению опасных природных явлений (лесные, торфяные и другие так называемые природные пожары, наводнения и пр.) и оказывают особенно негативное воздействие на экосистемы, хозяйство и здоровье человека. Наблюдаемый аномальный рост содержания диоксида углерода в атмосфере в так называемый индустриальный период (с 1850 г.) свидетельствует о преобладающей роли антропогенных выбросов парниковых газов (ПГ) в современном потеплении климата (IPCC, 2021), что подтверждается и пространственной согласованностью потепления (Neukom et al., 2019). Однако нельзя не учитывать естественные периоды потепления разного временного масштаба – тысячелетий (межледниковый период), столетий и десятилетий. Необычное потепление последних десятилетий может быть обусловлено

сочетанием естественных и антропогенных факторов (PAGES, 2019).

Принятое в 2015 г. Рамочной конвенцией ООН об изменении климата (РКИК ООН) Парижское соглашение (https://unfccc.int/documents?search2=&search3=paris_agreement_russian_.pdf) предполагает удержание прироста глобальной средней температуры намного ниже 2°C сверх доиндустриальных уровней и приложение усилий в целях ограничения роста температуры до 1.5°C, а также повышение способности адаптироваться к неблагоприятным воздействиям изменения климата (ст. 2). По мере смягчения изменений климата путем сокращения выбросов ПГ, прежде всего в энергетике, которая играет ключевую роль в поступлении ПГ в атмосферу (Клименко и др., 2022), возрастающее значение будет приобретать сектор ЗИЗЛХ (землепользование, изменение в землепользовании и лесное хозяйство), где принимаемые меры будут иметь наибольший экономический эффект (IPCC, 2021).

Сектор ЗИЗЛХ учитывает выбросы и поглощение ПГ, связанных с деятельностью человека (<https://unfccc.int/process-and-meetings/the-convention/glossary-of-climate-change-acronyms-and-terms>). Природные резервуары углерода как таковые не рассматриваются (<https://unfccc.int/resource/docs/cop7/13a01.pdf>, <https://unfccc.int/resource/docs/cop7/13a01.pdf#page=56>), однако без

понимания их специфики и климатической роли сложно оценить последствия антропогенного воздействия. Помимо CO_2 , необходим учет других ПГ, не регулируемых Монреальским протоколом и обладающих значительно более сильным, чем CO_2 , потенциалом глобального потепления (ППП): метана CH_4 и закиси азота N_2O , а также выноса растворенного углерода – DOC (dissolved organic carbon) – источника образования углеродсодержащих ПГ (IPCC, 2006).

Особое значение в секторе ЗИЗЛХ могут иметь антропогенные изменения торфяных болот – крупнейшего на суше и второго на планете (после океанических осадков) резервуара долговременного накопления атмосферного углерода, ведущего на суше природного источника метана и в ряде случаев источника закиси азота (Assessment..., 2008). Занимая 0.3% суши, осушенные торфяники¹ выделяют в результате микробного окисления торфа и торфяных пожаров ~2 Гт CO_2 , что составляет ~5% всех антропогенных эмиссий ПГ (Joosten et al., 2016). Эмиссия ими CO_2 в атмосферу может составлять более четверти выбросов ПГ, связанных с сектором ЗИЗЛХ (Tubiello et al., 2016). Из-за осушения болота планеты уже на рубеже 1960-х гг. могли превратиться из нетто-поглотителя в нетто-источник ПГ. Без принятия мер в отношении осушенных торфяников их эмиссия ПГ в 2020–2100 гг. может составить 12–41% объема выбросов ПГ, который необходимо сократить для достижения задач Парижского соглашения по климату (Leifeld et al., 2019).

Соглашение объединяет страны с целью борьбы с изменением климата и адаптации² к нему. Оно направлено на принятие решений на базе имеющихся научных данных и на основе национальных планов по борьбе с изменением климата – Определяемых на национальном уровне вкладов (ОНУВ), предполагающих действия по сокращению выбросов ПГ и по устойчивому развитию с целью адаптации к меняющемуся климату. Устанавливается комплексность подхода, не ограниченного задачей сокращения выбросов ПГ. В отношении суши Земли это было показано в Специ-

альном докладе МГЭИК (Межправительственная группа экспертов по изменению климата) “Изменение климата и земля” (Семенов и др., 2019; Изменение..., 2020; IPCC, 2019b). Его полное название “Об изменении климата, опустынивании, деградации земель, устойчивом управлении земельными ресурсами, продовольственной безопасности и потоках парниковых газов в наземных экосистемах” отражает необходимость комплексного рассмотрения проблемы изменения климата.

Нами сделана попытка проанализировать специфику болотных экосистем в связи с проблемой изменения климата, их значение в качестве резервуара и накопителя углерода, источника и поглотителя ПГ, влияние использования болот, вопросы учета и возможные меры по сокращению выбросов ПГ, а также другие аспекты, требующие внимания. Чрезвычайно большое количество публикаций по данной проблематике затрудняет их обзор. Поэтому для иллюстрации отдельных аспектов были использованы преимущественно ранее опубликованные нами работы, в которых уже содержится определенный анализ публикаций по конкретным вопросам.

ЭКОСИСТЕМЫ БОЛОТ

Постоянное или длительное избыточное увлажнение, наличие болотной растительности и отложений торфа – неотъемлемые условия существования торфяного болота. Избыток влаги способствует появлению болотных растений и препятствует разложению их остатков, которые формируют торф. Торф обеспечивает среду обитания этих растений и поддерживает баланс влаги в маловодные периоды. Благодаря физическим свойствам торф способен удерживать влагу, в десятки раз превышающую вес его скелетной части.

Накопление торфа и вертикальный рост торфяной залежи происходят благодаря превышению поступления растительных остатков над разложением в верхнем периодически ненасыщенном (аэробном) слое залежи. Не успевая полностью разложиться, они переходят в насыщенный водой (анаэробный) горизонт. Деление на активный и инертный горизонты (Иванов, 1953), за рубежом: acrotelm и catotelm (Ingram, 1979), широко распространено в экологии болот (Rydin, Jeglum, 2013). Предложенное изначально для гидрологии болот (преимущественно верховых) деление не столь однозначно (Сирин, 1999; Joosten, Clarke, 2002). Изотопные и другие данные показали, что для низинных болот напорного питания водообмен происходит во всей залежи, а для верховых, по крайней мере во всей выпуклой части – минимум до 2–3 м (Сирин и др., 1997). Это способствует микробиологической (Кравченко, Сирин, 2007) и в целом биогеохимической активности (Сирин и др., 1998; Rydin, Jeglum, 2013) этих слоев. Изотоп-

¹ Термин *торфяное болото* используется в отношении болот в естественном состоянии или близком к нему; термин *торфяник* относится ко всем объектам, имеющим или сохранившим торфяную залежь или ее часть, но утратившим болотный растительный покров в результате воздействия человека или других причин (Минаева, Сирин, 2011). Это соответствует международной практике использования терминов *mire* в первом случае и *peatland* – во втором (Rydin, Jeglum, 2013).

² Адаптация к изменению климата (adaptation) означает приспособление природных, социальных или экономических систем в ответ на фактические или ожидаемые климатические изменения, а также их последствия, а смягчение изменения климата (mitigation) заключается в принятии мер по снижению выбросов парниковых газов и увеличению их поглощения.

ные и гидрохимические данные (Sirin et al., 1998; Rydin, Jeglum, 2013) подтвердили известные ранее сведения о наличии водопроводящих слоев в глубине залежей. Образование метана в анаэробных слоях торфа, вероятно, подпитывается молодой органикой (Кравченко, Сирин, 2007; Charman et al., 1994), поступающей сверху благодаря водообмену и термической конвекции. Сезонные колебания температуры даже на верховых болотах достигают глубины 3–4 м и более (Сирин и др., 1998). Корни некоторых осок могут проникать на глубину нескольких метров за минеральным питанием и поставлять благодаря аэренхиме метан на поверхность болота (Jeglum, Rydin, 2013). Процессы разложения в глубоких слоях учитываются в классической модели роста болота (Clueto, 1984), и было бы ошибочно считать эти слои биогеохимически инертными.

Избыточное увлажнение на начальном этапе образования болот создается не только за счет атмосферных осадков, но и других источников: напорных вод (подземные и грунтовые), поемных вод в долинах рек и склоновых, стекающих в понижения рельефа с окружающих пространств. Их сочетание определяет водно-минеральное питание и структурно-функциональные особенности болот (Сирин, 1999), которые меняются по мере накопления торфа. Представленная в стратиграфии смена низинных торфов переходными и верховыми отражает последовательное изменение водно-минерального питания болотной экосистемы.

По мере роста торфяной залежи сокращается поступление грунтовых вод в корнеобитаемый слой, ограничивается минеральное питание, меняется растительный покров. При стабильном поступлении грунтовых вод болота могут не менять свою экологию сколь угодно долго, вне зависимости от роста залежи и поступления атмосферной влаги (Сирин, 1999). В ином случае с ростом залежи наступает момент, когда единственным источником питания остается атмосфера (осадки и пыль). Задействуются механизмы поглощения азота и минеральных веществ: выделение феноловых кислот для их растворения, насекомоедение, симбиоз с почвенными нитрофицирующими микроорганизмами (Минаева, Сирин, 2011). Недостатку влаги верховые болота противопоставляют механизмы защиты. При снижении уровней болотных вод в сухие периоды происходит разрыв капиллярной каймы в рыхлом поверхностном слое торфа, что резко сокращает испарение. Осветление (отмирание гиалиновых клеток) сфагновых мхов повышает альбедо поверхности, при затяжном недостатке осадков распространяются лишайники — потери влаги снижаются. При длительных засухах торфяная залежь может сжиматься, поддерживая таким образом уровень болотных вод относительно корнеобитаемой зоны, а в благоприятный период возвращаться обратно. Фено-

мен дыхания верховых болот был отмечен еще в 1902 г. (С.А. Weber and..., 2002).

Наиболее активные процессы происходят в верхнем корнеобитаемом слое залежи. Поэтому оправдано установление границы в 30 см для разделения торфяных болот и заболоченных мелкоотторфованных земель, как это принято в нашей (Торфяные..., 2001) и большинстве других стран, кроме Северной Америки, где граница полагается на уровне 40 см (Jeglum, Rydin, 2013). Верхний слой торфяной залежи болот определяет текущие условия обитания болотных растений, особенности биологического разнообразия (Минаева, Сирин, 2011). Большинство болот страны формировалось в голоцене после освобождения территории от покровного оледенения или морских вод, и их современное распространение и разнообразие — результат влияния условий среды на протяжении всей истории их развития.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И РАЗНООБРАЗИЕ БОЛОТ

Торфяные болота³ — одни из наиболее представленных экосистем на территории РФ (Болота..., 2017). Они занимают 1.39 млн км², а вместе с мелкоотторфованными (мощность торфа менее 30 см) заболоченными землями — 3.69 млн км² (рис. 1), или более 1/5 территории страны (рис. 1) (Вомперский и др., 1994, 2005, 2011). Заболоченность районов Европейского Севера или Западной Сибири может достигать 40% и более (Торфяные..., 2001). В европейской части России болота покрывают около 6% территории (~23 млн га), а вместе с мелкоотторфованными землями — 17.5% (~68 млн га) (Sirin et al., 2017). Заболоченность Российской Арктики, включая болота и мелкоотторфованные земли, превышает 30% (Болота..., 2019), и, вероятно, эта оценка занижена.

Болота в России традиционно относятся к разным категориям земель (Торфяные..., 2001), что затрудняет их инвентаризацию и учет⁴. Нами используются данные геоинформационной системы “Болота России” ИЛАН РАН, где интегриро-

³ Большинство областей знания и отраслей ссылается на закрепленное ГОСТом (Гидрология суши, 1973) определение болота: “природное образование, занимающее часть земной поверхности и представляющее отложения торфа, насыщенные водой и покрытые специфической растительностью”. В ботанике наличие торфа не является обязательным атрибутом болота (Нищенко, 1967), и для исключения семантических разночтений все шире используется термин *торфяное болото*, отраженный еще в Декрете СНК РСФСР от 17.05.1922 “О торфяных болотах”.

⁴ Водный кодекс РФ (Водный кодекс, 2006) относит болота к особым водным объектам, однако потребуется значительное время для внесения их в реестр, и одинаковые по типу болотные массивы (например, верховые) могут относиться к разным категориям земель с отличным, как следствие, законодательно-нормативным регулированием.

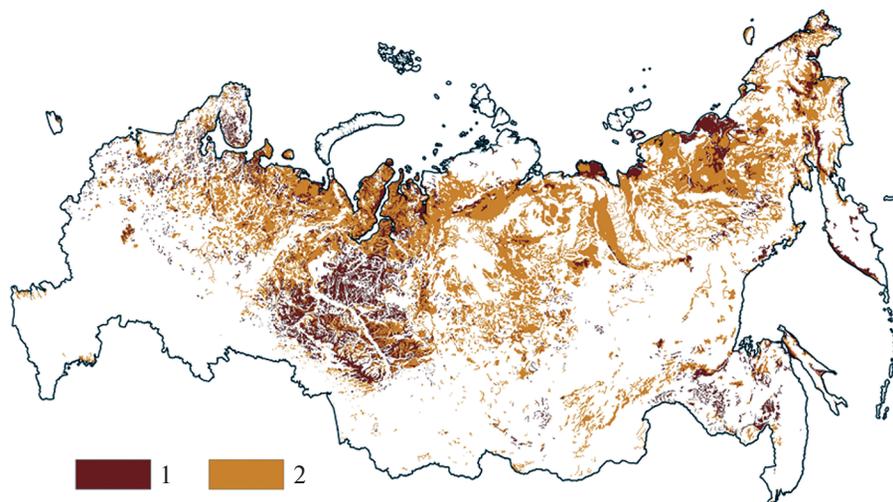


Рис. 1. Торфяные болота (торф >30 см) и заболоченные мелкоотторфованные земли (торф <30 см) в Российской Федерации. ГИС “Болота России” ИЛАН РАН (по Вомперский и др., 2011, с изменениями).

вана различная информация на основе данных почвенного картографирования (Вомперский и др., 1994, 2005). Проблема инвентаризации болот существует повсеместно (Joosten, Clarke, 2002; Assessment..., 2008), включая страны Европы (Tanneberger et al., 2017). Необходимы наземные данные, трудоемкие в получении и не совпадающие для разных стран, регионов, типов земель, что затрудняет интеграцию. Дистанционное зондирование Земли не позволяет достоверно определить наличие торфа, однако может быть эффективно применено для анализа растительного покрова болот, включая древесный (Вомперский и др., 2011), для оценки состояния болот (Медведева и др., 2011), для привязки наземных данных (Сирин и др., 2014). Особые сложности возникают при инвентаризации лесных болот (Вомперский и др., 2011) там, где болотная растительность утратила характерные черты, например при недостатке увлажнения и воздействии выпаса (Ильясов и др., 2018; Minayeva et al., 2005), а также в тундре из-за сходства растительности на участках с торфом и без него (Экологическая..., 2016).

Болота занимают примерно 3% суши планеты. В нашей стране находится более трети площади болот мира (Global..., 2022) и почти 40% болот Европы (Tanneberger et al., 2017). Более 20% площади болот страны – мерзлые (полигональные и бугристые), переходные болота – около 30%, верховые и низинные – по 18%, остальные площади заняты грядово-мочажинными и грядово-озерковыми комплексами (Вомперский и др., 2005). 62% болот – открытые, 21% – покрыты редколесной, а 17% – лесной растительностью (Вомперский и др., 2011). Разнообразие болот многократно шире и представлено на разных пространственных уровнях: болотных систем (комплексов болот), массивов (болот), микроландшафтов (фаций), микроформ (кочка, гряда, мочажина), элементов мозаики растительности (Минаева, Сирин, 2011; Rydin, Jeglum, 2013). На всех уровнях многообразие болот отражает различия в экологических условиях, в воздействии на внешнюю среду, на процессы и явления. Локальное воздействие может иметь более масштабные последствия (Minayeva et al., 2017). Важность сохранения целостности болот была закреплена на законодательном уровне (Водный кодекс, 2006, ст. 57), где предписано: “Осушение либо иное использование болот или их частей не должно приводить к ухудшению состояния неиспользуемых частей этих болот...”.

АНТРОПОГЕННО-ИЗМЕНЕННЫЕ ТОРФЯНИКИ

АНТРОПОГЕННО-ИЗМЕНЕННЫЕ ТОРФЯНИКИ

Значительная часть болот сохранилась в естественном состоянии, однако более 8 млн га болот страны были осушены для сельского и лесного хозяйства, добычи торфа: оценки приблизительны из-за неполной инвентаризации и специфики отраслевого учета (A quick scan..., 2009). Основные площади осушенных торфяников расположены в европейской части страны (Сирин et al., 2017; Tanneberger et al., 2017, 2021), на юге Западной Сибири и Дальнего Востока. В некоторых областях и республиках Центра европейской части России и Поволжья была осушена и освоена большая часть болот (A quick scan..., 2009).

Наибольшее воздействие на болота оказала добыча торфа, особенно фрезерным способом – самым распространенным в России и многих странах промышленным методом, который предполагает интенсивное осушение торфяного массива. По одним оценкам, торфоразработками бы-

ло изменено 0.85–1.5 млн га, по другим – 0.9 млн га болот, 70% которых – фрезерной добычей (Сирин и др., 2021; Sirin et al., 2021b). После выработки они подлежали рекультивации преимущественно для сельского хозяйства, реже – других целей. Нерекультивированные, частично или планомерно выработанные площади накапливались, особенно в 1990-х гг. (Сирин и др., 2011; A quick scan..., 2009). По статистическим данным, площадь торфопроизрастков снижалась с 2000 г. по 2007 г. с 261 до 219 тыс. га (Романовская и др., 2014). Эти данные включают как действующие, так и заброшенные месторождения, текущее состояние которых требует оценки. Зброшенные поля фрезерной добычи плохо зарастают растительностью и могут годами сохранять открытые участки торфа, выявляемые по спутниковым данным (Медведева и др., 2011, 2017; Сирин и др., 2020).

Торфяники, осушенные и используемые в сельском хозяйстве, могут занимать площадь до 5 млн га. Точно оценить сложно, поскольку статистика не делит осушенные площади с торфяными, торфянистыми и переувлажненными минеральными почвами (Торфяные..., 2001). Много болот было осушено для сельского хозяйства в долинах рек, в том числе в лесостепной зоне, по причине доступности и хозяйственного интереса к органическим почвам. Значительные площади используются в сельском хозяйстве после рекультивации частично выработанных фрезерным способом торфяных месторождений. Многие торфяники, осушенные и используемые ранее под пропашные культуры и сенокосы, были заброшены в последние десятилетия и зарастают рудеральной и древесно-кустарниковой растительностью. В более южных районах, например в лесостепной зоне, они могли настолько деградировать, что идентифицируются только по положению в рельефе и вскрытием сохранившихся под антропогенными почвами торфяных отложений (Ильсов и др., 2018).

Более 4 млн га болот было осушено для лесного хозяйства в центре, на северо-западе и западе европейской территории России, на юге Западной Сибири и в других регионах (Торфяные..., 2001). Чтобы избежать дефицита влаги при недостатке осадков, для лесного хозяйства применяется шадающее осушение, а с учетом сохранения исходного древостоя это определяет меньшее воздействие на торфяник, по сравнению с другими видами использования. При правильном выборе объектов, проведении гидромелиоративных и лесохозяйственных работ здесь могли сформироваться продуктивные древостои, однако во многих случаях ожидаемого существенного эффекта для лесного хозяйства не было.

Осушение и освоение болот для любого использования сопровождалось строительством дорожной

сети. Создание транспортной (дороги, нефте- и газопроводы) и иной инфраструктуры в заболоченных регионах без хозяйственного интереса непосредственно к болотам также приводит к изменению водного режима, растительности и экологического состояния прилегающих площадей болот. С учетом протяженности данных объектов суммарные площади таких воздействий могут быть очень значительными.

БОЛОТА И КЛИМАТ

Термический режим и осадки определяют возможность образования торфа: необходимы достаточная первичная продукция и препятствие ее полному разложению. Этим объясняется то, что болота в основном приурочены к умеренной зоне и влажным тропикам (Charman, 2002). С климатическим фактором связано современное разнообразие болот. Некоторые болота (черноольховые, тростниковые и др.) могут встречаться в разных природных зонах, другие – климатически детерминированы. Такими являются мерзлые болота (полигональные и бугристые), морфология которых обязана сочетанию мерзлотного протаивания, выпучивания и растрескивания (Minayeva et al., 2019).

Болота сохраняют в торфяных отложениях информацию как об изменении климата прошлого (споры и пыльца растений окружающих пространств), так и о своем текущем состоянии (Barber, 1981; Charman, 2002; Rydin, Jeglum, 2013). Ботанический состав, степень разложения, другие характеристики торфа, угли, прослойки пепла и минеральные включения информируют о растительном покрове, водном режиме и экологическом состоянии болота (Barber, 1981; Charman, 2002; Rydin, Jeglum, 2013). Это позволяет оценить его реакцию на изменение климата в прошлом (Barber, 1981; Charman, 2002; Assessment..., 2008; Peatlands and climate..., 2008; Rydin, Jeglum, 2013) и делать прогнозы на будущее.

Имеется много данных о развитии болот на фоне палеоклиматических условий (Charman, 2002; Peatlands and climate..., 2008), в некоторых случаях возможно получение информации в столетнем масштабе (Клименко и др., 2001). Свидетельством резких, возможно, климатически обусловленных изменений могут быть следы пожаров, смыва отдельных горизонтов и т.д. Особый интерес представляет реакция болот на изменение климата последних тысячелетий, когда они находились на близкой современной стадии развития. Для всей Евразии прослеживается рост болот в холодные и его сокращение в теплые термические фазы (рис. 2) (Климанов, Сирин, 1997; Klimanov, Sirin, 1997), в том числе в малый климатический оптимум (900–1200 лет назад) и малый ледниковый период (1300–1850 гг.) – характерные палеоклима-

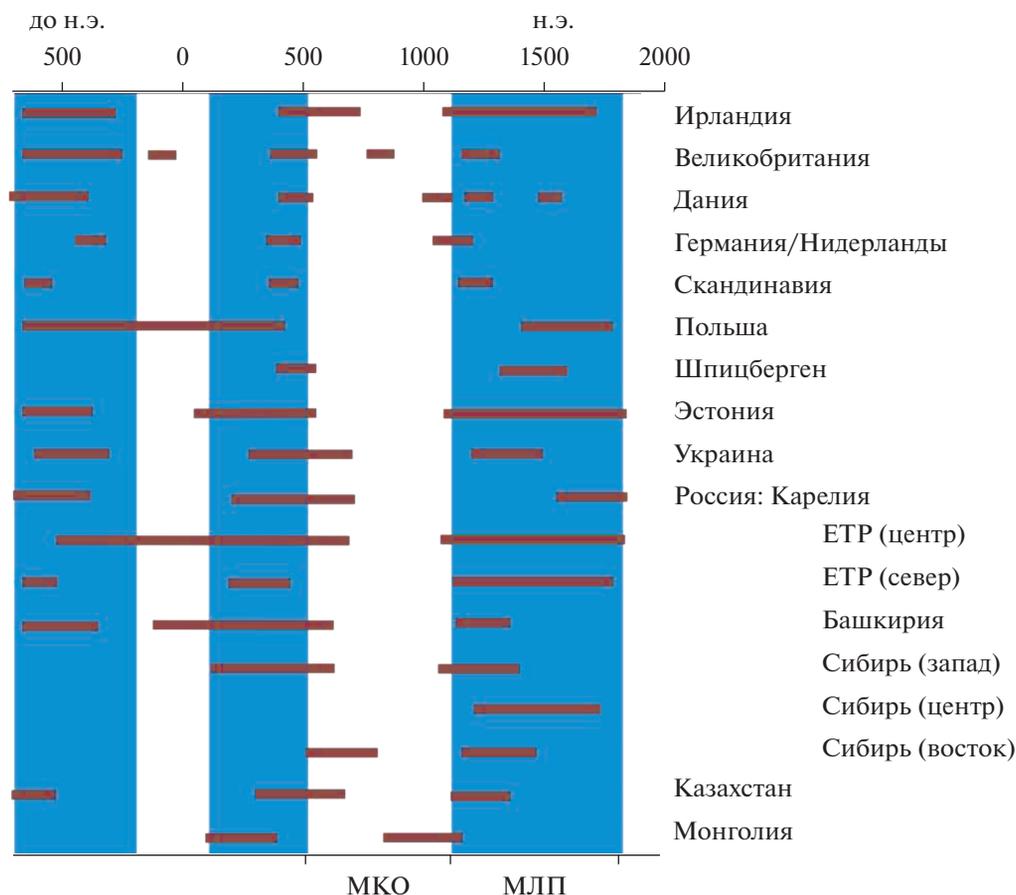


Рис. 2. Периоды активного роста болот в Евразии в субатлантический период голоцена (по: Климанов, Сирина, 1997; Klimanov, Sirin, 1997, с изменениями). ЕТР – европейская территория России; МКО – малый климатический оптимум; МЛП – малый ледниковый период.

тические периоды прошлого тысячелетия (Fagan, 2000). Эти фазы состоят из разновременных термических колебаний (PAGES, 2019) и свидетельствуют об общих тенденциях реакции болот, которые могут быть намного сложнее (Rydin, Jeglum, 2013). Моделирование с учетом динамики болот в прошлом прогнозирует (при значительной неопределенности) сокращение площади болот и запаса в них углерода с усилением этой тенденции при росте климатических изменений (Müller, Joos, 2021).

Устойчивость болот определяется их гидрологией (Иванов, 1975). Низинные болота – более субсидируемые системы (Lugo et al., 1990): дополнительный приток влаги обеспечивает их независимость от изменений атмосферного увлажнения. Сравнение расположенных рядом верховых и низинных болот в центре европейской территории России показало большую стабильность последних на протяжении трех тысячелетий. Реакция верховых болот отличалась в зависимости от условий стока с них воды, определяемых характером залегания – на суглинках или песках (Сирина,

1999). Более детальное рассмотрение выявило различия в их реакции и на менее длительные изменения климата (Rauber, 2002).

Суточное и в пределах сезона изменение погодно-климатических условий влияет на физиологические процессы в живых организмах, круговорот вещества и энергии. В масштабах года могут меняться сроки фенологических явлений. За десятилетие и более возможны изменения видовой структуры, состава и доминирования видов. В масштабе столетия и более возможно смещение границ биомов. Ввиду высокой специфичности экологических условий видовой состав обитателей болот достаточно устойчив, их присутствие будет зависеть от сохранения данного местообитания. Состояние болот и их пространственная структура определяют видовое разнообразие болотной растительности. При деградации и потере болотных местообитаний наиболее угрожаемыми будут облигатные гелофиты (Минаева, Сирина, 2011).

Современное изменение климата уже сказывается на болотах. Параллельно с распространением древесной растительности в тундре и подня-

тия верхней границы леса в горах (IPCC, 2019b) отмечается рост облесенности болот (Lachance et al., 2005). Потепление усиливает таяние мерзлоты, однако реакция мерзлых болот разнонаправлена и ее значительность не подтверждается (Heffernan et al., 2020). Увеличивается частота торфяных пожаров (Turetsky et al., 2015), которые могут возникать от тундры до степей (Minayeva et al., 2012). Растет уязвимость болот южных регионов, степи и лесостепи. Усиливающаяся засушливость климата (Lu et al., 2009) и снижение продуктивности пастбищ дренированных местообитаний смещает выпас на более влажные, торфяные почвы, менее устойчивые к его воздействию (Minayeva et al., 2005). Антропогенный фактор увеличивает уязвимость болот к изменению климата. Дорожная сеть способствует протаиванию мерзлых болот (Экологическая..., 2016), неиспользуемые осушенные болота лесной зоны наиболее подвержены торфяным пожарам (Sirin et al., 2020), перевыпас нарушает растительный покров более южных торфяников, способствуя деградации торфяных почв, водной и ветровой эрозии. Это ведет к потере углерода, увеличивает эмиссию ПГ и, в конечном счете, оказывает обратное воздействие болот на климат.

УГЛЕРОД И ПАРНИКОВЫЕ ГАЗЫ

Болота играют особую роль в формировании газового состава атмосферы. Запас углерода болот составляет 500 ± 100 Гт С (Yu, 2012), и существующие оценки варьируют: только для северных болот в диапазоне 300–600 Гт С (Qiu et al., 2021). Это более 20% почвенного углерода, 60% атмосферы и больше углерода биомассы лесов (Joosten et al., 2016). На нашу страну может приходиться от 1/5 (Вомперский и др., 1994) до 1/3 (Botch et al., 1995) углерода болот мира. Во всех природных зонах болота многократно опережают зональные экосистемы по запасу углерода на единицу площади: в тундре в 3.5 раза, а в таежной зоне в 7 раз (Assessment..., 2008).

Болота лидируют на суше и занимают второе место на планете после океанических осадков как долговременные накопители углерода атмосферы. Большая часть угля и значительная доля нефти и газа являются результатом преобразования отложений болот прошлых геологических эпох (Assessment..., 2008). Есть мнение, что связывание углерода в торфяниках в период межледниковий — основная причина снижения концентрации CO_2 в атмосфере и возможный спусковой механизм для наступления оледенений (Joosten et al., 2016). Значения долговременного относительного накопления углерода (long-term apparent rate of carbon accumulation — LARCA или LORCA), определяемые по датировкам торфа по ^{14}C и запасу углерода в вышележащем слое, составляют для северных болот 25–35 г м^{-2} год $^{-1}$ (Rydin, Jeglum,

2013). Намного выше они могут быть для мелкоотторфованных земель (рис. 3) (Минаева и др., 2008), роль которых с учетом их площадей в стране (Вомперский и др., 1994, 2005, 2011) явно недооценивается.

Поглощая CO_2 из атмосферы в результате фотосинтеза и накапливая его в торфе, болота выделяют метан и в некоторых случаях закись азота (рис. 4) — парниковые газы с более высоким, относительно CO_2 , ПГП. Периодически корректируемый в сторону увеличения он сейчас составляет за 100-летний период 25 и 298 соответственно (<https://unfccc.int/resource/docs/2013/cop19/eng/10a03.pdf>). Результирующее влияние болот на парниковый эффект будет зависеть прежде всего от соотношения величин CO_2 и CH_4 . Болота — основной источник метана на суше, а вклад северных болот может составлять в зависимости от оценки их площади 31–38 Тг CH_4 год $^{-1}$ (Peltola et al., 2019). Время пребывания CH_4 в атмосфере существенно короче, чем CO_2 , и в долгосрочной перспективе торфяники оказывают охлаждающее влияние на климат (Frolking, Roulet, 2007). На коротких интервалах при рассмотрении влияния хозяйственной деятельности и мер по смягчению изменения климата необходим учет всех связанных с болотами ПГ.

На потоки ПГ в болотах влияет широкий спектр сложно взаимосвязанных биологических, физических и химических процессов (Assessment..., 2008), их баланс может меняться в зависимости от погодно-климатических условий. Болото, являющееся стоком CO_2 в нормальный год, становится источником CO_2 не только в жаркий и сухой, но и во влажный и прохладный год (Aleksyuchik et al., 2021). Разные болота и в разных регионах могут действовать асинхронно. Это затрудняет общие оценки и прогноз влияния естественных болот на изменение климата. Расчеты по разным моделям предполагают скорее нейтральную роль болот в балансе парниковых газов в перспективе, но и смещение в сторону их отрицательного влияния при потеплении климата (Qiu et al., 2021). Последнее согласуется и с другими прогнозами, сопровождаемыми справедливым, на наш взгляд, заключением о сложности анализа, недоучете роли болот и недостатке знаний для понимания взаимосвязи болот, углерода и климата (Loisel et al., 2021).

АНТРОПОГЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ И ПАРНИКОВЫЕ ГАЗЫ

Осушение болот для любых целей изменяет водный режим болот и соотношение периодически аэробной активной и постоянно анаэробной инертной зон (рис. 4) (Laine et al., 1996). Меняются процессы и, как следствие, потоки ПГ, степень

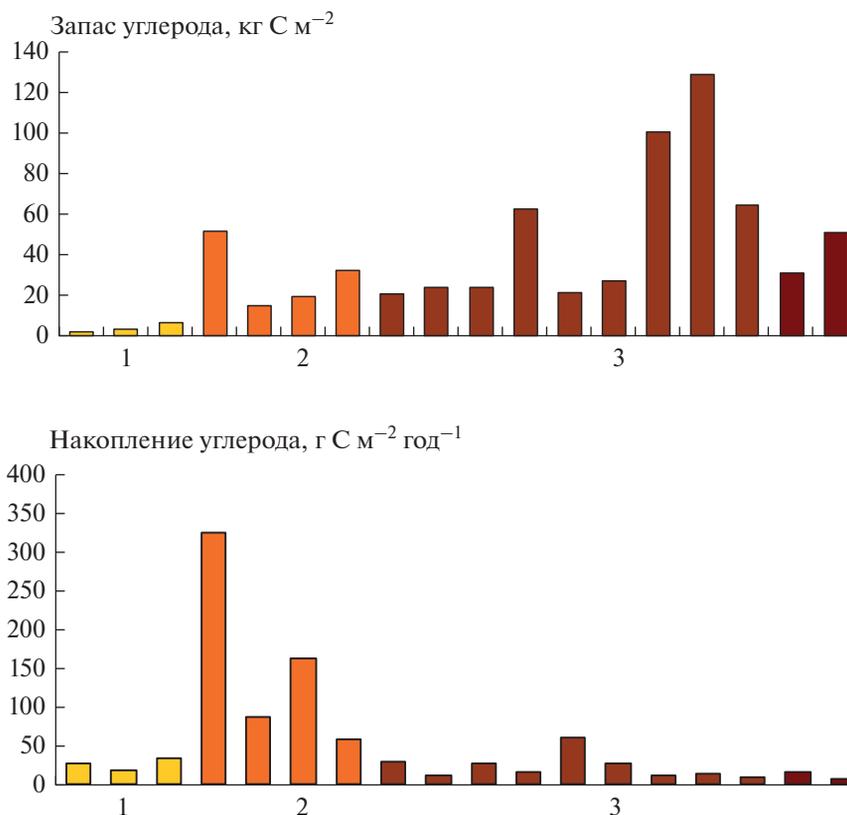


Рис. 3. Запас и накопление углерода в минеральных почвах суходольных местообитаний (1); в торфянисто и торфяно-глеяных почвах мелкоотторфованных местообитаний и мелкозалежных болот (2); в торфяных почвах верховых и низинных болот (3) (по: Минаева и др., 2008, с изменениями).

трансформации которых, а также дополнительные потери углерода биомассы и торфа зависят от интенсивности дренажа, цели и характера предполагаемого использования.

Наиболее сильное воздействие оказывает добыча торфа, особенно фрезерным способом. Он включает в себя предварительное осушение на горно-ловчими каналами по контуру торфяного массива для перехвата внешних поверхностных и грунтовых вод, далее осушение магистральным и валовыми каналами глубиной до 3 м и последующее эксплуатационное – картовыми каналами глубиной до 1.5 м, углубляемыми по мере поверхностно-послойной сработки нафрезерованного и высушенного непосредственно на месте торфа. Ширина карт (межканавных пространств) определяется свойствами залежи и обычно составляет ~40 м, для верховых торфов – меньше (Сирин, Суворов, 2022).

На стадии подготовки площадей к добыче торфа проводится очистка от растительности. В случае верхового облесенного болота потери углерода фитомассы составили ~20 т С га⁻¹. При добыче торфа изымалось 25–32 т С га⁻¹ год⁻¹. Эмиссия CO₂ на заброшенном участке торфодобычи и, видимо, близкая ей на разрабатываемых фрезерных

полях в зависимости от условий года составляет 1.6–4.7 т С га⁻¹ год⁻¹ (Суворов и др., 2015). Таким образом, за счет разложения осушенного торфа потери углерода могут составлять 10% и более от изымаемого при интенсивной добыче торфа. Это без учета потерь при водной и, неизбежной для разрыхленного для уборки торфа, ветровой эрозии. Теряется углерод, накопленный столетиями и тысячелетиями назад, со скоростью, характеризующейся LORCA, в 0.14–0.17 т С га⁻¹ год⁻¹, что медленнее потерь с эмиссией CO₂ в 10 раз и с добычей торфа – в 100 раз (Суворов и др., 2015). Происходит эмиссия CH₄ с основных площадей при кратковременном увлажнении (Суворов и др., 2010; Чистотин и др., 2016), а также в значительных количествах из хорошо прогреваемой осушительной сети (Сирин, Суворов, 2022).

Заброшенные без рекультивации поля фрезерной добычи торфа годами не зарастают растительностью, теряют углерод, выделяя CO₂ и CH₄, а также N₂O. Из-за потери контроля со стороны пользователя, обеспечивавшего обязательные затраты на противопожарные мероприятия, такие площади становятся объектами торфяных пожаров (Сирин и др., 2011). Их высокая горимость

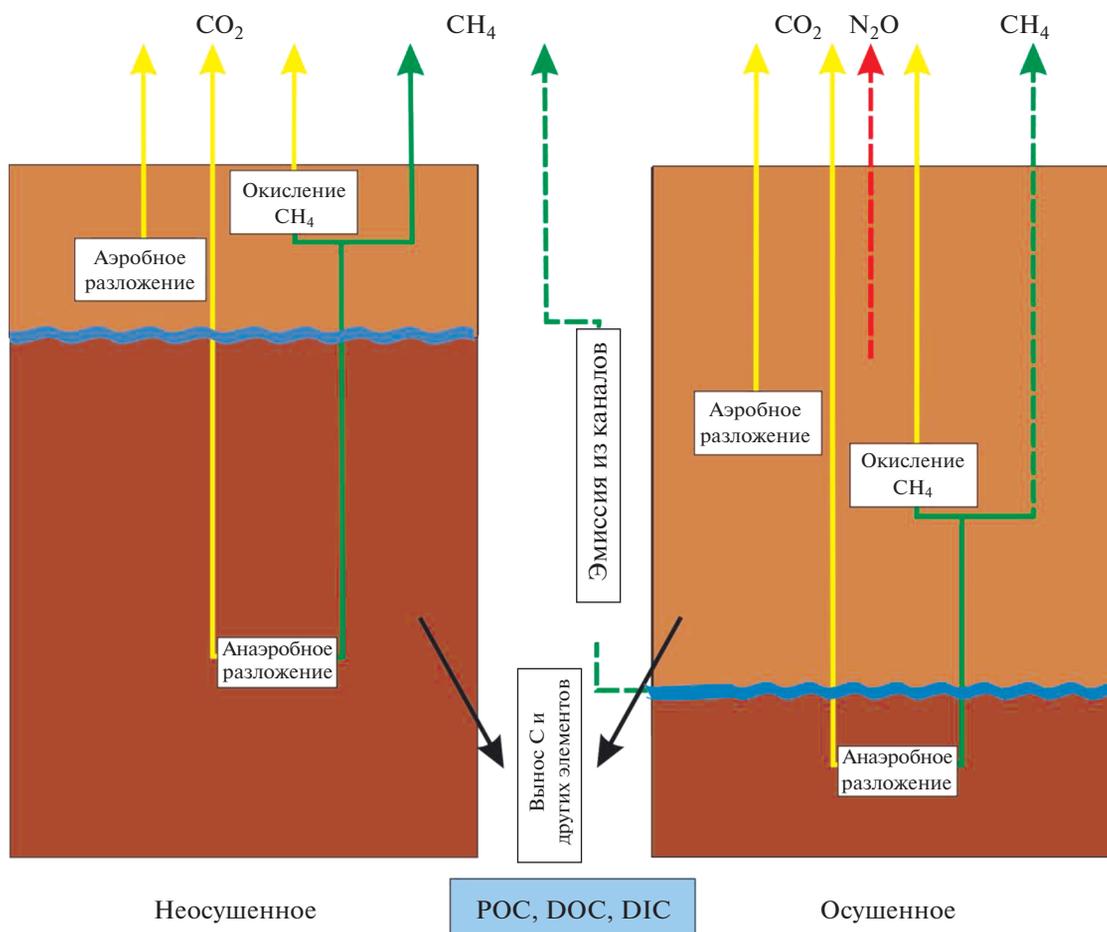


Рис. 4. Изменение основных потоков парниковых газов (CO_2 , CH_4 и N_2O) после осушения торфяного болота (по: Laine et al., 1996, с изменениями). POC (particulate organic carbon) – частицы органического углерода; DOC (dissolved organic carbon) – растворенный углерод; DIC (dissolved inorganic carbon) – растворенный неорганический углерод.

обусловлена не осушением, а отсутствием пользователя, заинтересованного и обеспечивающего защиту от торфяных пожаров. Это касается также площадей, осушенных для сельского и лесного хозяйства.

Эмиссия CO_2 из осушенных торфяников, используемых для сельского хозяйства, обычно выше, что связано с подготовкой и последующей обработкой почвы, и зависит от характера использования – под пашню, сенокосы или пастбища. Удобрения, а также обогащение почвы при выпасе стимулируют разложение почвы, появление и усиление эмиссии N_2O . Более интенсивная, по сравнению с сенокосами, эмиссия CO_2 характерна для пропашных культур, где углерод теряется также из-за ветровой и водной эрозии. Интенсивно выделяется CH_4 из осушительной сети и в некотором количестве при временном увлажнении почвы. Может происходить эмиссия N_2O (Peatlands and climate..., 2008).

Наименьшие потери углерода происходят при лесосушении. Сказывается меньшая интенсивность осушения и увеличение продуктивности лесных насаждений. Из-за различий объектов и сложности оценки текущего баланса CO_2 выводы о влиянии лесосушения на баланс углерода торфяников разнятся – они могут быть как стоком, так и источником CO_2 (Peatlands and climate..., 2008; Päivänen, Hännell, 2012; Rydin, Jeglum, 2013; Escobar et al., 2022). Происходит эмиссия CH_4 из каналов (Сирин и др., 2012), вынос растворенного и взвешенного углерода со стоком, возможное выделение N_2O в случае богатых почв.

Согласно РККК ООН, Национальный доклад о кадастре антропогенных выбросов из источников и абсорбции поглотителями ПГ, не регулируемых Монреальским протоколом, включает несколько категорий земель, в которые входят осушенные торфяники: лесные земли; пахотные; пастбища и сенокосы; в разделе водно-болотные угодья (wetlands) – торфяники, осушенные для

добычи торфа – подготовленные, разрабатываемые и неиспользуемые (IPCC, 2006). Дополнение по водно-болотным угодьям (IPCC, 2014) к Руководящим принципам национальных инвентаризаций парниковых газов МГЭИК (IPCC, 2006) уточнило методики учета осушенных торфяников и добавило рекомендации по учету выбросов из вторично обводненных торфяников (rewetted peatlands). В Уточнение 2019 г. к Руководящим принципам МГЭИК 2006 г. по национальным инвентаризациям парниковых газов (IPCC, 2019a) были внесены дополнения для затопленных земель (flooded lands), которые входят в категорию водно-болотных угодий и могут возникать при обводнении торфяников.

Значительные потери углерода и, соответственно, выбросы CO₂ происходят при торфяных пожарах. Пожары могут возникать в сухие годы и на естественных болотах (Сирин и др., 2011), однако чаще на осушенных и заброшенных после добычи торфа или сельскохозяйственного использования торфяниках. Человеческий фактор – основная причина пожаров, а для осушенных торфяников, расположенных в населенных районах, эта причина очевидна. При торфяных пожарах происходит наибольшая гибель древостоя из-за повреждения сосущих корней (Вомперский и др., 2007), значительная потеря почвенного углерода, которая растет с интенсивностью осушения (Глухова, Сирин, 2018). Единовременные выбросы CO₂ при лесоторфяном пожаре составили в результате сгорания торфа 400 т CO₂ га⁻¹, а с учетом потери фитомассы древостоя более 600 т CO₂ га⁻¹ (Сирин и др., 2019; Sirin et al., 2021a). Выделить торфяные среди других природных пожаров сложно (Sirin et al., 2022), как и оценить связанные с ними потери углерода. Поэтому, несмотря на понимание значимости влияния последствий пожаров на выбросы CO₂ и климат, методики их учета остаются недоработанными (IPCC, 2014).

СОКРАЩЕНИЕ ВЫБРОСОВ ПАРНИКОВЫХ ГАЗОВ

Возможные пути снижения потерь углерода, выбросов ПГ из антропогенно-измененных торфяников – ограничение осушения и освоения (переустройства) болот, улучшение управления используемыми торфяниками и их восстановление (IPCC, 2019b). Осушение и освоение новых площадей для добычи торфа, сельского и лесного хозяйства в нашей стране в последнее время практически не ведутся. Хозяйственное воздействие на болота при строительстве транспортной и иной инфраструктуры затрагивает сравнительно ограниченные площади и носит в большинстве случаев вынужденный характер. При слож-

ности работ на болотах будет выбран, по возможности, альтернативный вариант.

Улучшение управления осушенными лесами, с учетом задачи сокращения потерь углерода и выбросов ПГ, касается проведения рубок и, в первую очередь, снижения пожарной опасности. Проведение рубок в осушенных лесах требует мер по ограничению нарушения почв, их эрозии и выносу растворенной и взвешенной органики по дренажной сети. Несмотря на понижение уровня болотных вод на осушенных лесных площадях, в целом лесосушение повышает их противопожарную защиту. Дренажная сеть ограничивает распространение низового и торфяного (подземного) пожара, а созданные проезды, переходы, противопожарные водоемы повышают возможность осуществления оперативных мер при возникновении очагов огня. Необходимы поддержание, ремонт и, при необходимости, реконструкция этой инфраструктуры.

Первоочередная мера в улучшении управления осушенными сельскохозяйственными землями – отказ от использования их под пашню с заменой на сенокосы. Смена категории земель с *пахотные* (croplands) на *сенокосы* (grasslands) позволяет учесть, в соответствии с методиками МГЭИК (IPCC, 2006, 2014), изменение баланса парниковых газов и потерь углерода. Перевод в сенокосы снизит также потери углерода при ветровой эрозии и других факторах. Значительные площади осушенных земель, ранее использовавшиеся под сенокосы и пастбища, в настоящее время заброшены, зарастают древесно-кустарниковой и рудеральной растительностью. Сухая трава весной и потеря контроля со стороны пользователя – причины частых травяных пожаров, нередко переходящих в торфяные. Эффективный путь повышения пожарной безопасности, снижения потерь углерода и сокращения выбросов ПГ – возвращение использования таких площадей. Одно-двухразовое кошение за сезон без применения удобрений не увеличивает эмиссию CO₂ (рис. 5) и позволяет получить экологически чистый сенаж (Молчанов и др., 2020; Piyasov et al., 2021). Сенокосение почти двукратно увеличивает подземную фитомассу (Молчанов и др., 2020; Piyasov et al., 2021), а плотность корневой системы улучшает защиту торфяных почв от эрозии и потерь углерода. Снижение количества сухой травы весной и контроль пользователя снижают вероятность возникновения неконтролируемых пожаров.

Наиболее эффективный путь снижения выбросов ПГ из осушенных торфяников – их вторичное обводнение для восстановления водно-болотных угодий (Leifeld, Menichetti, 2018). В первую очередь это касается заброшенных полей фрезерной добычи торфа и сельскохозяйственных земель при отсутствии экономического инте-

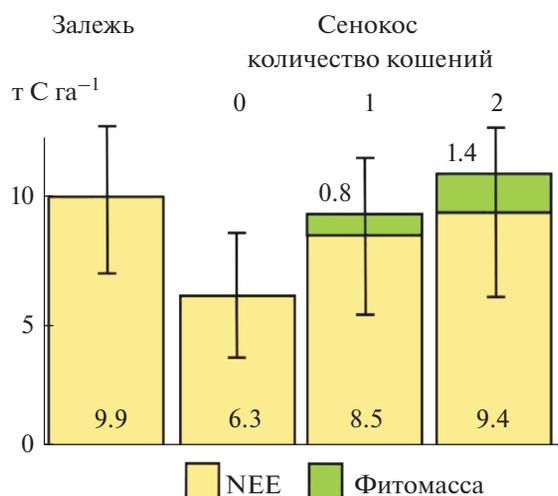


Рис. 5. Нетто-экосистемный обмен CO_2 осушенного торфяника с заброшенным сенокосом и с сенокосом, используемым с разной частотой косов за сезон (по: Pyasov et al., 2021, с изменениями). NEE (net ecosystem CO_2 -exchange) — чистый экосистемный CO_2 -газообмен, фитомасса, изымаемая при косовании.

реса возвращения последних в хозяйственный оборот. Согласно Водному кодексу РФ (Водный кодекс, 2006), рекультивация торфоразработок должна проводиться преимущественно путем обводнения и искусственного заболачивания. Участки влаголюбивой растительности характеризуются поглощением CO_2 , которое становится стабильнее при повышении уровня грунтовых вод (рис. 6). После вторичного обводнения (2017 г.) торфяника Берказан-Камыш в Природном парке Аслы-Куль, Республика Башкортостан (Природные условия..., 2017) увеличивается площадь болотной растительности, что сокращает эмиссию CO_2 с достижением в дальнейшем его поглощения, которое в перспективе перекроет и возросшую эмиссию CH_4 .

УЧЕТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБВОДНЕНИЯ ТОРФЯНИКОВ

Вторично обводненные торфяники — объект национальной отчетности об антропогенных источниках и поглотителях ПГ, не регулируемых Монреальским протоколом. Официальной статистики обводненных торфяников в РФ нет. В таких случаях МГЭИК (IPCC, 2006, 2014, 2019a) предусматривает возможность перехода на 2-й и 3-й уровни сложности (Tier 2 и 3). Могут использоваться оригинальные методики определения площадей рассматриваемых категорий земель и специфичные для страны или даже региона коэффициенты эмиссии ПГ (emission factors) — годовые удельные потоки ПГ, для валидации которых тре-

буется их опубликование в рецензируемых научных журналах.

Была разработана, верифицирована по наземным данным и апробирована методика дистанционного мониторинга состояния пожароопасных и обводняемых торфяников (Медведева и др., 2011, 2017; Сирин и др., 2020; Sirin et al., 2018, 2020). На ее основе была предложена методика учета эффективно обводненных площадей торфяников для Национального кадастра антропогенных источников и поглотителей парниковых газов (Сирин и др., 2021; Sirin et al., 2021b). В границах объектов обводнения предложено учитывать площади, занятые гидрофильной растительностью, а также покрытые водой. Такие участки могут быть отнесены к категориям, определяемым Дополнением по водно-болотным угодьям (IPCC, 2014) к Руководящим принципам по национальным инвентаризациям парниковых газов МГЭИК (IPCC, 2006), *увлажненных органических почв* (rewetted organic soils) и *затопленных земель* (flooded lands) соответственно.

Сокращение выбросов в результате обводнения торфяников включено с 2021 г. в Национальный доклад РФ о кадастре антропогенных выбросов из источников и абсорбции поглотителями парниковых газов, не регулируемых Монреальским протоколом, представляемый в Секретариат РКИК ООН (Russian..., 2021). Расчеты проводятся для эффективно обводненных площадей с использованием коэффициентов эмиссии (КЭ), данных МГЭИК (IPCC, 2006, 2014, 2019a) по умолчанию (default factors), то есть уровень 1. Используется допущение о принадлежности обводненных площадей в 1990 базовом году к торфоразработкам, используемым или заброшенным. Значения КЭ, полученные по многолетним измерениям на торфоразработках в центре европейской территории России (Сирин, Суворов, 2022), были выше по ряду показателей КЭ МГЭИК (IPCC, 2014). Переход на специфичные для страны (региона) КЭ скорректирует получаемые оценки сокращения, как предполагаем, в сторону увеличения.

После катастрофических пожаров 2010 г. в Московской обл. было обводнено в 2010–2013 гг. более 73 тыс. га пожароопасных торфяников — наиболее масштабный проект в Северном полушарии (Сирин и др., 2020). Оценка на 2020 г. установила наличие 8.3 тыс. га эффективно обводненных площадей — 5.7 тыс. га, занятых гидрофильной растительностью, и 2.6 тыс. га — водными объектами. Сокращение выбросов ПГ составило 32 тыс. т CO_2 -экв год⁻¹, а без учета увеличения эмиссии CH_4 — почти 72 тыс. т CO_2 -экв год⁻¹ (Russian..., 2021). Это соответствует сокращению выбросов ~ 0.44 т CO_2 -экв га⁻¹ год⁻¹ из расчета на всю площадь обводнения (73 тыс. га) и 3.9 т CO_2 -экв га⁻¹ год⁻¹ на образовавшиеся вод-

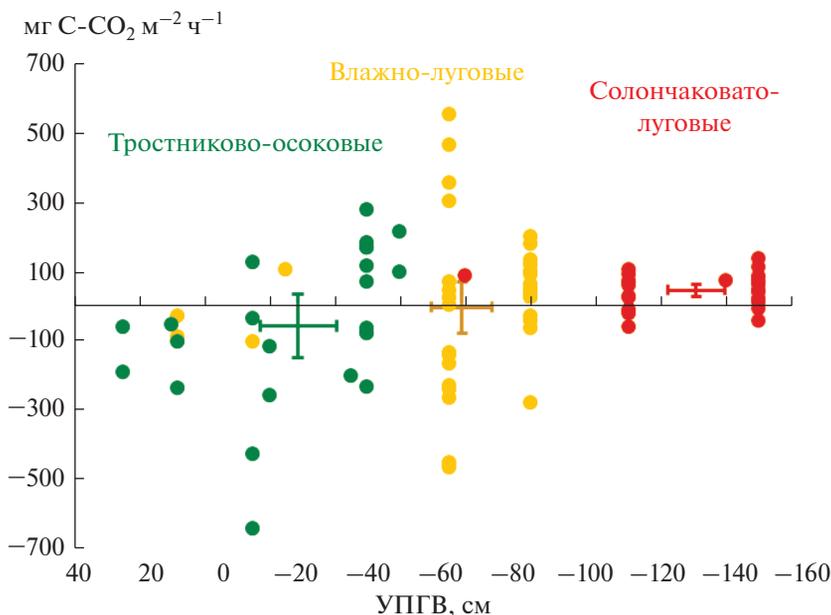


Рис. 6. Нетто-экосистемный обмен в растительных сообществах осушенного торфяника в лесостепной зоне. Показано среднее \pm стандартное отклонение для УПГВ и потоков диоксида углерода (по: Ильясов, 2019, с изменениями). УПГВ – уровень почвенно-грунтовых вод.

но-болотные угодья – гидрофильная растительность и водные объекты (8.3 тыс. га).

Данный подход может быть использован и для оценки снижения выбросов ПГ в результате вторичного обводнения конкретных объектов (рис. 7). Например, для участка торфяника Радовицкий Мох площадью 1.5 тыс. га в Шатурском р-не Московской обл. сокращение выбросов CO₂ составило на 2020 г. 29 тыс. т (или 1.9 тыс. т га⁻¹), а с учетом всех ПГ и выноса растворенного углерода – DOC (dissolved organic carbon) – 18 тыс. т CO₂-экв (или 1.2 тыс. т га⁻¹). К 2050 г. сокращение выбросов накопительным итогом может составить по прогнозу ~110 и ~67 тыс. т CO₂-экв соответственно (Sirin et al., 2021b). Оценки консервативны (то есть минимальны), не учитывают эффекта обводнения для всей площади объектов обводнения и для снижения выбросов ПГ от торфяных пожаров. Их учет, а также переход, по данным натурных измерений, на КЭ регионального уровня могут в перспективе уточнить и, скорее всего, повысить оценку сокращения выбросов ПГ.

Особенно важен учет снижения числа и площади возможных торфяных пожаров и связанных с ними потерь углерода и выброса CO₂. Площадь, пройденную пожарами на торфяниках, можно определить путем наложения границ гарей на контуры торфяников, однако не все лесные и травяные пожары, особенно весной, когда торф влажный, заглубляются и переходят в разряд торфяных. Их можно идентифицировать по длительности пожара и пожарной радиационной мощности (Sirin et al.,

2022). Сложность представляет также оценка потерь углерода биомассы и особенно торфа (Глухова, Сирин, 2018; Сирин и др., 2019; Sirin et al., 2021). Решение этих задач может помочь более обоснованной оценке эффективности обводнения с точки зрения сокращения потерь углерода и выброса ПГ. Данные по Национальному парку “Мещера” во Владимирской обл. (Сирин и др., 2011) или по Московской обл. свидетельствуют (рис. 8) о сокращении числа и площади пожаров после проведения обводнения пожароопасных торфяников (Sirin et al., 2020).

СМЯГЧЕНИЕ, АДАПТАЦИЯ, ОБЕСПЕЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ

Анализ имеющихся данных показывает, что восстановление болот путем вторичного обводнения торфяников значительно сокращает выбросы ПГ в атмосферу (Wilson et al., 2016), даже несмотря на возможное увеличение эмиссии CH₄ (Günther et al., 2020), что обычно отмечается оппонентами этих мероприятий. Помимо учета в национальных кадастрах антропогенных источников и поглотителей парниковых газов в рамках РКИК ООН, эти мероприятия активно включаются в схемы добровольного сокращения выбросов ПГ (Углеродные кредиты..., 2011; Carbon credits..., 2011). Предлагаются стандарты – GEST (Greenhouse gas emission site type) – для оценки эффективности проектов обводнения для добровольного рынка, например VCS (verified carbon standard,

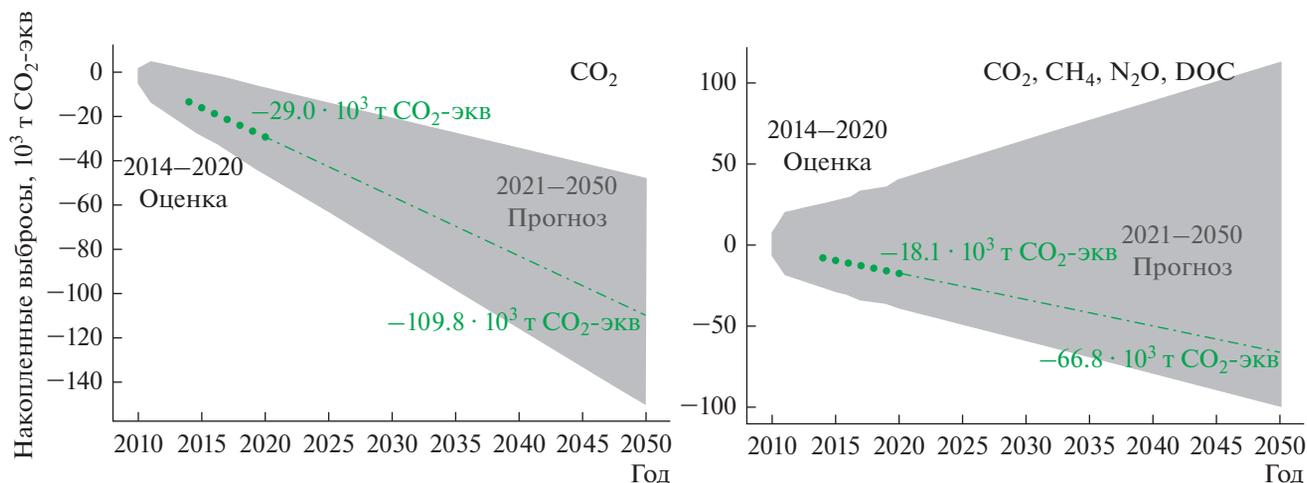


Рис. 7. Изменение после обводнения выбросов CO₂ (слева) и всех агентов (справа) с учетом их ППП нарастающим итогом для тестового участка торфяника Радовицкий Мох (1535 га) в Московской обл. Оценка на 2020 г. и прогноз до 2050 г. Серым цветом показан 95%-ный доверительный интервал (по: Sirin et al., 2021b, с изменениями). DOC (dissolved organic carbon) – вынос растворенного углерода.

www.v-c-s.org) на основе типизации участков растительного покрова для привязки значений потоков ПГ (Couwenberg et al., 2011). Это привлекает финансирование к обводнению торфяников и способствует получению и уточнению региональных оценок потоков ПГ с осушенных и обводняемых торфяников (Jarašius et al., 2022). В этом аспекте есть отставание даже от стран Восточной Европы и Балтии, в том числе по причине несоответствия проводимых научных исследований практическим задачам по обеспечению сокращения выбросов ПГ в сфере землепользования, включая торфяники.

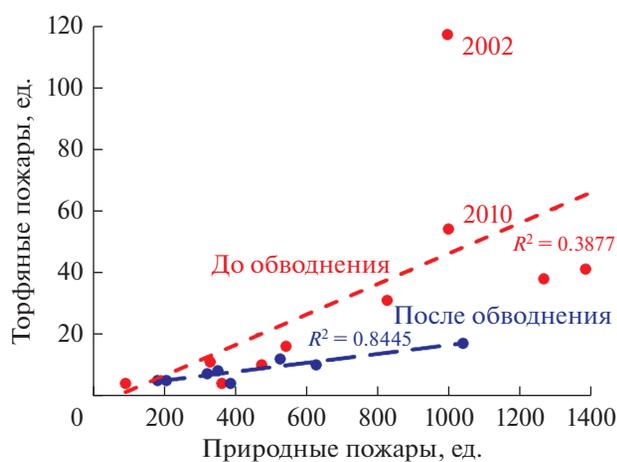


Рис. 8. Количество торфяных пожаров в границах объектов обводнения относительно количества всех природных пожаров в Московской обл. до и после обводнения 2010–2013 гг. (по: Sirin et al., 2020, с изменениями).

Сокращение выбросов ПГ и смягчение изменения климата часто рассматриваются узконаправлено без учета возможности решения задач адаптации к происходящим изменениям климата и обеспечения устойчивости (sustainable management), которое должно включать в себя выбор наилучших практик рационального природопользования. Комплексный подход позволяет минимизировать ошибки, которые могут возникать при решении задач по сокращению выбросов ПГ и переходу к низкоуглеродной экономике, особенно в многофакторной сфере ЗИЗЛХ, а также более объективно оценить эффективность проводимых мероприятий.

Изменение управления сельскохозяйственными землями (замена пахотных земель сенокосами, возвращение использования заброшенных сенокосных угодий) может дать сокращение выбросов ПГ и потерь углерода. Это сокращение вряд ли будет значительным для стимулирования таких мероприятий за счет углеродного рынка. Получение экологически чистой продукции, снижение воздействия на окружающую среду за счет сокращения водной и ветровой эрозии, снижение вероятности пожаров, а также повышение привлекательности территории может увеличить общие выгоды от проведенных мероприятий.

В Специальном докладе МГЭИК “Изменение климата и земля” (Изменение..., 2020; IPCC, 2019b) было отмечено, что восстановление болот направлено на наиболее богатые углеродом земли, поэтому такие мероприятия требуют меньших площадей и, соответственно, оказывают меньшее воздействие на структуру землепользования, по сравнению с другими мерами в секторе ЗИЗЛХ. Восстановление болот требует в 3 раза меньше

азота, по сравнению с аналогичными по эффективности мерами по накоплению углерода в минеральных почвах (Leifeld, Menichetti, 2018), способствует восстановлению биоразнообразия (Minaeva et al., 2017), гидрологических (Ahmad et al., 2020) и других экосистемных функций болот (Bonn et al., 2014).

Восстановление болот снижает вероятность торфяных пожаров (Granath et al., 2016; Sirin et al., 2020), предотвращение которых – основной аргумент и движущий фактор обводнения торфяников в нашей стране. Обводнение не только сокращает значительные потери углерода и выброс CO_2 в атмосферу, связанные с пожарами. Предотвращается выброс черного углерода (сажи), который из-за атмосферного переноса имеет значительные отрицательные последствия для окружающей среды, включая климат. Из-за низкой температуры горения торфяные пожары – источник поступления в атмосферу крайне опасных для здоровья человека мелкодисперсных частиц. Смог во время пожаров 2010 г. в Московском регионе (Kovalov et al., 2011) на фоне аномально высокой температуры воздуха (Baggiopetro et al., 2011) стал причиной увеличения показателя избыточной смертности более чем на 10 тыс. человек (Ревич и др., 2015); экономический ущерб мог превысить 100 млрд руб. (Порфирьев, 2013). Необходимость предотвращения таких последствий очевидна и является эффективной мерой адаптации к изменениям климата, которые усиливают вероятность такого рода катастрофических явлений. Комплексный подход позволяет объективно оценить эффективность мероприятий по смягчению изменений климата, а также согласовать их с задачами адаптации к этим изменениям и обеспечения устойчивости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Торфяные болота – важнейший компонент глобального цикла углерода, лидер на суше и второй на планете накопитель углерода в геологическом масштабе времени. Занимая 3% суши, они в несколько раз опережают другие экосистемы по запасу углерода на единицу площади. Болота – ключевой природный источник эмиссии в атмосферу метана, они также могут выделять закись азота, с ними связано поступление органики в водные объекты.

Болота отличает от других экосистем превышение продукции растений над разложением их остатков, накапливаемых в виде торфа в условиях избыточного увлажнения. Скорость накопления углерода варьирует для разных болот, природных и погодно-климатических условий. Болота отличаются пространственной неоднородностью, с которой связаны значительные различия в потоках ПГ.

Торфяные болота – одни из наиболее представленных экосистем, и вместе с заболоченными мелкоотторфованными местообитаниями занимают более 1/5 территории страны. Они расположены в различных природных зонах и крайне разнообразны. 10% мировых болот было осушено для сельского и лесного хозяйства, добычи торфа. В России эта цифра примерно в 2 раза ниже, однако в ряде регионов европейской территории России было осушено 50% и более. Много болот было изменено в результате строительства дорог, других линейных объектов и иных воздействий. Неиспользуемые осушенные торфяники – наиболее частые объекты торфяных пожаров.

Осушенные торфяники планеты могут выделять при окислении торфа и пожарах ~5% всех антропогенных эмиссий ПГ, или более 25%, связанных с землепользованием, сельским и лесным хозяйством (ЗИЗЛХ). После осушения продолжается эмиссия метана, нередко происходит эмиссия закиси азота, теряется углерод с водной и ветровой эрозией. Значительные потери углерода и, соответственно, выбросы CO_2 в атмосферу происходят при торфяных пожарах. Эмиссия ПГ осушенными торфяниками составляет значительную часть объема выбросов, которые необходимо сократить для удержания глобального потепления и для выполнения задач Парижского соглашения по климату.

Основные пути снижения выбросов ПГ антропогенно-измененными торфяниками для смягчения изменений климата: ограничение осушения и освоения (переустройства) болот, улучшение управления используемыми торфяниками (перевод пашни в сенокосы, возвращение последних в оборот), восстановление болот. Наиболее эффективный путь снижения выбросов ПГ из осушенных торфяников – их вторичное обводнение для восстановления водно-болотных угодий. Обводненные торфяники были включены в национальную отчетность РФ об антропогенных источниках и поглотителях парниковых газов, результаты научных исследований и разработок используются для научного сопровождения мероприятий по восстановлению водно-болотных угодий в разных регионах страны, разработки предложений для ОНУВ и Стратегий по адаптации к изменению климата.

Восстановление болот снижает вероятность торфяных пожаров, предотвращение которых – основной аргумент и движущий фактор обводнения торфяников в нашей стране, способствует восстановлению биоразнообразия, других экосистемных услуг, связанных с болотами, повышает экологическую безопасность. Эти и другие мероприятия по сокращению выбросов парниковых газов для смягчения изменений климата вносят дополнительный вклад в адаптацию к ним и обеспечение устойчивости.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен сотрудникам Лаборатории лесного болотоведения и Центра сохранения и восстановления болотных экосистем Института лесоведения РАН за помощь в работе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20185), а на стадии доработки в рамках государственного задания ИЛАН РАН в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации от 2 сентября 2022 г. № 2515-р в целях реализации важнейшего инновационного проекта государственного значения, направленного на создание единой национальной системы мониторинга климатически активных веществ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Болота // Экологический атлас России / Ред. Н.С. Касимов, В.С. Тикунов. М.: Феория, 2017. С. 118–121.
- Болота // Российская Арктика: пространство, время, ресурсы. Атлас / Агафонова С.А., Айбулатов Д.Н., Бабурин В.Л. и др. М.: Феория, 2019. С. 344–345.
- Водный кодекс Российской Федерации от 03.06.2006 № 74-ФЗ.
- Вомперский С.Э., Иванов А.И., Цыганова О.П. и др. Заболоченные органогенные почвы и болота России и запас углерода в их торфах // Почвоведение. 1994. № 12. С. 17–25.
- Вомперский С.Э., Сирин А.А., Цыганова О.П. и др. Болота и заболоченные земли России: попытка анализа пространственного распределения и разнообразия // Изв. РАН. Сер. геогр. 2005. № 5. С. 39–50.
- Вомперский С.Э., Глухова Т.В., Смагина М.В., Ковалев А.Г. Условия и последствия пожаров в сосняках на осушенных болотах // Лесоведение. 2007. № 6. С. 35–44.
- Вомперский С.Э., Сирин А.А., Сальников А.А. и др. Оценка площади болотных и заболоченных лесов России // Лесоведение. 2011. № 5. С. 3–11.
- Второй оценочный доклад Росгидромета об изменениях климата и их последствиях на территории Российской Федерации / Ред. В.В. Ясюкевич, В.А. Говоркова, И.А. Корнева и др. М.: Росгидромет, 2014. 1009 с.
- Гидрология суши. Термины и определения. ГОСТ 19179-73. М.: Государственный Комитет СССР по стандартам, 1973. 34 с.
- Глухова Т.В., Сирин А.А. Потери почвенного углерода при пожаре на осушенном лесном верховом болоте // Почвоведение. 2018. № 5. С. 580–588. <https://doi.org/10.7868/S0032180X18050076>
- Иванов К.Е. Гидрология болот. Л.: Гидрометеиздат, 1953. 299 с.
- Иванов К.Е. Водообмен в болотных ландшафтах. Л.: Гидрометеиздат, 1975. 280 с.
- Изменение климата и земля. Специальный доклад МГЭИК об изменении климата, опустынивании, деградации земель, устойчивом управлении земельными ресурсами, продовольственной безопасности и потоках парниковых газов в наземных экосистемах. Резюме для политиков / Ред. V. Masson-Delmotte, Н.-О. Pörtner, J. Skea et al. М.: МГЭИК, 2020. 39 с.
- Ильясов Д.В. Современное состояние осушенного болотного массива в условиях лесостепи (на примере урочища Берказан-Камыш, Республика Башкортостан): Автореф. дис... канд. биол. наук. М.: ИЛАН РАН, 2019. 24 с.
- Ильясов Д.В., Сирин А.А., Суворов Г.Г. и др. Почвы и растительность антропогенно-измененного торфяника в степной зоне (на примере массива Берказан-Камыш, Башкирия) // Агрохимия. 2018. № 12. С. 46–59.
- Климанов В.А., Сирин А.А. Динамика торфонакопления болотами Северной Евразии за последние 3000 лет // Докл. АН. 1997. Т. 354. № 5. С. 683–686.
- Клименко В.В., Климанов В.А., Сирин А.А., Слепцов А.М. Изменения климата на западе европейской части России в позднем голоцене // ДАН. 2001. Т. 376. № 5. С. 679–683.
- Клименко В.В., Клименко А.В., Терешин А.Г., Микушина О.В. Сможет ли энергопереход остановить глобальное потепление и почему так сильно ошибаются климатические прогнозы? // Теплоэнергетика. 2022. № 3. С. 5–19. <https://doi.org/10.1134/S0040363622030067>
- Кравченко И.К., Сирин А.А. Активность и метаболический контроль образования метана в глубоких слоях торфа бореальных болот // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 888–895.
- Медведева М.А., Возбранная А.Е., Барталев С.А., Сирин А.А. Оценка состояния заброшенных торфоразработок по многоспектральным спутниковым изображениям // Иссл. Земли Косм. 2011. № 5. С. 80–88.
- Медведева М.А., Возбранная А.Е., Сирин А.А., Маслов А.А. Возможности различных многоспектральных спутниковых данных для оценки состояния неиспользуемых пожароопасных и обводняемых торфоразработок // Иссл. Земли Косм. 2017. № 3. С. 76–84. <https://doi.org/10.7868/S0205961417020051>
- Минаева Т.Ю., Сирин А.А. Биологическое разнообразие болот и изменение климата // Успехи соврем. биол. 2011. Т. 131. № 4. С. 393–406.
- Минаева Т.Ю., Трофимов С.Я., Чичагова О.А. и др. Накопление углерода в почвах лесных и болотных экосистем Южного Валдая в голоцене // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. № 5. С. 607–616.
- Молчанов А.Г., Суворов Г.Г., Ильясов Д.В., Сирин А.А. Потоки диоксида углерода при разном режиме использования сенокоса на осушенной торфяной почве // Агрохимия. 2020. № 9. С. 48–64. <https://doi.org/10.31857/S00021881200900>
- Ниценко А.А. О терминологии основных понятий болотоведения // Бот. журн. 1967. Т. 52. № 11. С. 1692–1696.

- Порфирьев Б.Н. Экономическая оценка людских потерь в результате чрезвычайных ситуаций // *Вопр. эконом.* 2013. № 1. С. 46–68.
- Природные условия и биота Природного парка “Аслы-Куль” / Ред. Б.М. Миркин, В.Б. Мартыненко. Уфа: Башк. энцикл., 2018. 456 с.
- Ревич Б.А., Шапошиников Д.А., Перишаген Г. Новая эпидемиологическая модель по оценке воздействия аномальной жары и загрязненного атмосферного воздуха на смертность населения (на примере Москвы 2010 г.) // *Профилактикт. мед.* 2015. Т. 18. № 5. С. 29–33.
<https://doi.org/10.17116/profmed201518529-33>
- Романовская А.А., Коротков В.Н., Смирнов Н.С. и др. Оценка вклада землепользования в антропогенную эмиссию парниковых газов на территории России в течение 2000–2011 гг. // *Метеорол. гидрол.* 2014. № 3. С. 5–18.
- Семенов С.М., Гладыльщикова А.А., Дмитриева Т.М. Антропогенные нарушения взаимодействия суши и атмосферы: оценки МГЭИК // *Фунд. прикл. климатол.* 2019. Т. 3. С. 5–31.
<https://doi.org/10.21513/2410-8758-2019-3-05-31>
- Сирин А.А. Водообмен и структурно-функциональные особенности лесных болот: на примере европейской тайги: Автореф. дис... докт. биол. наук. М.: ИЛАН, 1999. 44 с.
- Сирин А.А., Суворов Г.Г. Эмиссия парниковых газов на торфоразработках в центре Европейской России // *Метеорол. гидрол.* 2022. № 3. С. 68–80.
<https://doi.org/10.52002/0130-2906-2022-3-68-80>
- Сирин А.А., Шумов Д.Б., Власова Л.С. Изучение водообмена в болотных водах с помощью результатов анализа ^3H // *Вод. рес.* 1997. № 6. С. 679–687.
- Сирин А.А., Нильсон М., Шумов Д.Б. и др. Сезонные изменения растворенного метана в вертикальном профиле болот Западнорусской низины // *ДАН* 1998. Т. 361. № 2. С. 280–283.
- Сирин А.А., Минаева Т.Ю., Возбранная А.Е., Бартаев С.А. Как избежать торфяных пожаров? // *Наука в России.* 2011. № 2. С. 13–21.
- Сирин А.А., Суворов Г.Г., Чистотин М.В., Глаголев М.В. О значениях эмиссии метана из осушительных каналов // *Динам. окр. среды глоб. измен. клим.* 2012. Т. 3. № 2. С. 1–10.
- Сирин А.А., Маслов А.А., Валяева Н.А. и др. Картографирование торфяных болот Московской области по данным космической съемки высокого разрешения // *Лесоведение.* 2014. № 5. С. 65–71.
- Сирин А.А., Макаров Д.А., Гуммерт И. и др. Глубина прогорания торфа и потери углерода при лесном подземном пожаре // *Лесоведение.* 2019. № 5. С. 410–422.
<https://doi.org/10.1134/S0024114819050097>
- Сирин А.А., Медведева М.А., Макаров Д.А. и др. Мониторинг растительного покрова вторично обводненных торфяников Московской области // *Вестн. СПбГУ. Науки о Земле.* 2020. Т. 65. № 2. С. 314–336.
<https://doi.org/10.21638/spbu07.2020.206>
- Сирин А.А., Медведева М.А., Ильясов Д.В. и др. Обводненные торфяники в климатической отчетности Российской Федерации // *Фунд. прикл. климатол.* 2021. Т. 7. № 3. С. 84–112.
<https://doi.org/10.21513/2410-8758-2021-3-84-112>
- Суворов Г.Г., Чистотин М.В., Сирин А.А. Влияние растительности и режима увлажнения на эмиссию метана из осушенной торфяной почвы // *Агрохимия.* 2010. № 12. С. 37–45.
- Суворов Г.Г., Чистотин М.В., Сирин А.А. Потери углерода при добыче торфа и сельскохозяйственном использовании осушенного торфяника в Московской области // *Агрохимия.* 2015. № 11. С. 51–62.
- Торфяные болота России: к анализу отраслевой информации / Ред. А.А. Сирин, Т.Ю. Минаева. М.: ГЕОС, 2001. 190 с.
- Углеродные кредиты и заболачивание деградированных торфяников. Климат – Биоразнообразие – Землепользование / Ред. Ф. Таннебергер, В. Вихтманн. Stuttgart: Schweizerbart Science Publishers, 2011. 221 с.
- Чистотин М.В., Суворов Г.Г., Сирин А.А. Динамика эмиссии метана из осушенной торфяной почвы в зависимости от растительности и режима увлажнения (результаты вегетационного опыта) // *Агрохимия.* 2016. № 12. С. 20–33.
- Экологическая реставрация в Арктике: обзор международного и российского опыта / Ред. Т.Ю. Минаева. Сыктывкар–Нарьян-Мар: Триада, 2016. 288 с.
- A quick scan of peatlands in Central and Eastern Europe / Eds T. Minayeva, A. Sirin, O. Bragg. Wageningen: Wetlands Int., 2009. 132 p.
- Ahmad S., Liu H., Günther A. et al. Long-term rewetting of degraded peatlands restores hydrological buffer function // *Sci. Tot. Environ.* 2020. V. 749. P. 141571.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141571>
- Alekseychik P., Launiainen S., Mammarella I. et al. Carbon balance of a Finnish bog: temporal variability and limiting factors based on 6 years of eddy-covariance data // *Biogeosciences.* 2021. V. 18. P. 4681–4704.
<https://doi.org/10.5194/bg-18-4681-2021>
- Assessment on peatlands, biodiversity and climate change. Main report / Eds F. Parish, A. Sirin, D. Charman et al. Global Environment Centre, Kuala Lumpur and Wetlands International, Wageningen, 2008. 179 p.
- Barber K.E. Peat stratigraphy and climatic change. A paleoecological test of the theory of cyclic peat bog regeneration. Rotterdam: A.A. Balkema, 1981. 219 p.
- Barriopedro D., Fischer E.M., Luterbacher J. et al. The hot summer of 2010: redrawing the temperature record map of Europe // *Science.* 2011. V. 332. P. 220–224.
<https://doi.org/10.1126/science.1201224>
- Bonn A., Reed M., Evans C.D. et al. Investing in nature: developing ecosystem service markets for peatland restoration // *Ecosyst. Serv.* 2014. V. 9. P. 54–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2014.06.011>
- Botch M.S., Kobak K.I., Vinson T.S., Kolchugina T.P. Carbon pools and accumulation in peatlands of the former Soviet Union // *Glob. Biogeochem. Cycles.* 1995. V. 1 (9). P. 37–46.
- C.A. Weber and the raised bog of Augstuma / Eds J. Couwenberg, H. Joosten. Tula: Grif & K, 2002. 278 p.
- Carbon credits from peatland rewetting. Climate – biodiversity – land use / Eds F. Tanneberger, W. Wichtmann. Stuttgart: E. Schweizerbart Science Publishers, 2011. 223 p. www.schweizerbart.com/9783510652716
- Charman D. Peatlands and environmental change. Chichester: Wiley, 2002. 320 p.
- Charman D.J., Aravena R., Warner B.G. Carbon dynamics in a forested peatland in north-eastern Ontario, Canada // *J. Ecol.* 1994. V. 82. P. 55–62.
- Clymo R.S. The limits to peat bog growth // *Philos. Trans. R. Soc. B.* 1984. V. 303. P. 605–654.

- Couwenberg J., Michaelis D., Joosten H. et al. Assessing greenhouse gas emissions from peatlands using vegetation as a proxy // *Hydrobiologia*. 2011. V. 674. P. 67–89.
- Escobar D., Belyazid S., Manzoni S. Back to the future: restoring northern drained forested peatlands for climate change mitigation // *Front. Environ. Sci.* 2022. V. 10. P. 834371.
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.834371>
- Fagan B. The little ice age: how climate made history, 1300–1850. N.Y.: Basic Books, 2000. 246 p.
- Frolking S., Roulet N.T. Holocene radiative forcing impact of northern peatland carbon accumulation and methane emissions // *Glob. Change Biol.* 2007. V. 13 (5). P. 1079–1088.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01339.x>
- Global Peatland Database. Greifswald Mire Centre, 2022.
<https://greifswaldmoor.de/global-peatland-database-en.html>
- Granath G., Moore P., Lukenbach M., Waddington J.M. Mitigating wildfire carbon loss in managed northern peatlands through restoration // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 28498.
<https://doi.org/10.1038/srep28498>
- Günther A., Barthelmes A., Huth V. et al. Prompt rewetting of drained peatlands reduces climate warming despite methane emissions // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1644.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15499-z>
- Heffernan L., Estop-Aragonés C., Knorr K.-H. et al. Long-term impacts of permafrost thaw on carbon storage in peatlands: deep losses offset by surficial accumulation // *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 2020. V. 125. P. e2019.
<https://doi.org/10.1029/2019JG005501>
- Ilyasov D.V., Molchanov A.G., Suvorov G.G. et al. Net ecosystem exchange of carbon dioxide on hayland with drained peat soil in central European Russia: mowing scenario analysis // *Arch. Agron. Soil Sci.* 2021. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1080/03650340.2021.1982135>
- Ingram H.A.P. Soil layers in mires: function and terminology // *J. Soil Sci.* 1979. V. 29. P. 224–227.
- IPCC, 2006. 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme. V. 4. Agriculture, forestry and other land use / Eds H.S. Eggleston, L. Buendia, K. Miwa et al. Hayama: IPCC, 2006. <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp>
- IPCC, 2014. 2013 Supplement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories: Wetlands / Eds T. Hiraishi, T. Krug, K. Tanabe et al. Switzerland: IPCC, 2014.
- IPCC, 2019. 2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories / Eds E. Calvo Buendia, K. Tanabe, A. Kranjc et al. Switzerland: IPCC, 2019a.
- IPCC, 2019. Climate Change and Land. An IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems / Eds P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia et al. Switzerland: 2019b. <https://www.ipcc.ch/srccl/>
- IPCC, 2021. Climate Change 2021: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the sixth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change / Eds V. Masson-Delmotte, P. Zhai, A. Pirani et al. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2021.
- Jarašius L., Etzold J., Truus L. et al. Handbook for assessment of greenhouse gas emissions from peatlands. Applications of direct and indirect methods by LIFE Peat Restore. Vilnius: Lithuanian Fund for Nature, 2022. 201 p.
- Joosten H., Clarke D. Wise use of mires and peatlands – background and principles including a framework for decision-making. Saarijarvi: Saarijarven Offset Oy, 2002. 303 p.
- Joosten H., Sirin A., Couwenberg J. et al. The role of peatlands in climate regulation // *Peatland restoration and ecosystem services: science, policy and practice* / Eds A. Bonn, T. Allott, M. Evans et al. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2016. P. 63–76.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139177788.005>
- Klimanov V.A., Sirin A.A. The dynamics of peat accumulation by mires of Northern Eurasia during the last three thousand years // *Northern forested wetlands: ecology and management*. Ch. 22 / Eds C.C. Trettin, M.F. Jurgensen, D.F. Grigal et al. Boca Raton, N.Y., L., Tokyo: Lewis Publ., 1997. P. 313–324.
- Konovalov I.B., Beekmann M., Kuznetsova I.N. et al. Atmospheric impacts of the 2010 Russian wildfires: integrating modelling and measurements of an extreme air pollution episode in the Moscow region // *Atmosph. Chem. Phys.* 2011. V. 11. P. 10031–10056.
<https://doi.org/10.5194/ACP-11-10031-2011>
- Lachance D., Lavoie C., Desrochers A. The impact of peatland afforestation on plant and bird diversity in south-eastern Québec // *Écoscience*. 2005. V. 12. P. 161–171.
- Laine J., Silvola J., Tolonen K. et al. Effect of water-level drawdown on global climatic warming: northern peatlands // *Ambio*. 1996. V. 25 (3). P. 179–184.
- Leifeld J., Menichetti L. The underappreciated potential of peatlands in global climate change mitigation strategies // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 1071.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03406-6>
- Leifeld J., Wüst-Galley C., Page S. Intact and managed peatland soils as a source and sink of GHGs from 1850 to 2100 // *Nat. Clim. Change*. 2019. V. 9. P. 945–947.
<https://doi.org/10.1038/s41558-019-0615-5>
- Loisel J., Gallego-Sala A.V., Amesbury M.J. et al. Expert assessment of future vulnerability of the global peatland carbon sink // *Nat. Clim. Change*. 2021. V. 11. P. 70–77.
<https://doi.org/10.1038/s41558-020-00944-0>
- Lu Y., Zhuang Q., Zhou G. et al. Possible decline of the carbon sink in the Mongolian Plateau during the 21st century // *Environ. Res. Lett.* 2009. V. 4. P. 045023.
<https://doi.org/10.1088/1748-9326/4/4/045023>
- Lugo A.E., Brinson M.M., Brown S. Synthesis and search for paradigms in wetland ecology // *Ecosystems of the World. Forested Wetlands* / Eds A.E. Lugo, M. Brinson, S. Brown. Amsterdam: Elsevier, 1990. P. 447–460.
- Minayeva T., Sirin A., Dorofeyuk N. et al. Mongolian mires: from taiga to desert // *Stapfia*. 2005. V. 85. P. 335–352.
- Minayeva T., Sirin A.A., Stracher G.B. The peat fires of Russia // *Coal and peat fires: a global perspective* / Eds G.B. Stracher, A. Prakash, E.V. Sokol. Amsterdam, Waltham: Elsevier, 2012. P. 375–394.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59412-9.00019-3>
- Minayeva T.Y., Bragg O.M., Sirin A.A. Towards ecosystem-based restoration of peatland biodiversity // *Mires Peat*. 2017. V. 19. P. 1–7.
<https://doi.org/10.19189/MaP.2013.OMB.150>
- Minayeva T., Sirin A., Kershaw P., Bragg O. Arctic peatlands // *The wetland book* / Eds C. Finlayson, G. Milton, R. Prentice, N. Davidson. Dordrecht: Springer, 2019. P. 275–288.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-6173-5_109-2

- Müller J., Joos F. Global peatlands under future climate – seamless model projections from the last glacial maximum // *Biogeosciences*. 2021. V. 18. P. 3657–3687. <https://doi.org/10.5194/bg-18-3657-2021>
- Neukom R., Steiger N., Gómez-Navarro J.J. et al. No evidence for globally coherent warm and cold periods over the preindustrial Common Era // *Nature*. 2019. V. 571. P. 550–554. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1401-2>
- PAGES 2k Consortium. Consistent multidecadal variability in global temperature reconstructions and simulations over the Common Era // *Nat. Geosci.* 2019. V. 12. P. 643–649. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0400-0>
- Päivänen J., Hännell B. Peatland ecology and forestry – a sound approach. Helsinki: Helsingin yliopiston metsätieteiden laitos, 2012. 267 p.
- Peatlands and climate change / Ed. M. Strack. Saarijaarvi: Saarijarven Offset Oy, 2008. 223 p.
- Peltola O., Vesala T., Gao Y. et al. Monthly gridded data product of northern wetland methane emissions based on upscaling eddy covariance observations // *Earth Syst. Sci. Data*. 2019. V. 11. P. 1263–1289. <https://doi.org/10.5194/essd-11-1263-2019>
- Qiu C., Ciais P., Zhu D. et al. A strong mitigation scenario maintains climate neutrality of northern peatlands // *One Earth*. 2021. V. 5. P. 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.12.008>
- Rauber C. Stability of raised bogs to climate change – a case study. Aachen: Shaker Verlag GmbH, 2002. 168 p.
- Russian Federation. 2021 National Inventory Report (NIR) // The United Nations Framework Convention on Climate Change. <https://unfccc.int/documents/273477>
- Rydin H., Jeglum J. The biology of peatlands. 2nd edition. Oxford: Oxford Univ. Press, 2013. 382 p.
- Sirin A., Köhler S., Bishop K. Resolving flow pathways in a headwater forested wetland with multiple tracers // *IASH Publ.* 1998. V. 248. P. 337–342.
- Sirin A., Minayeva T., Yurkovskaya T. et al. Russian Federation (European Part) // *Mires and peatlands of Europe: status, distribution and conservation* / Eds H. Joosten, F. Tanneberger, A. Moen. Stuttgart: Schweizerbart Sci. Publ., 2017. P. 589–616. <https://doi.org/10.1127/mireseurope/2017/0001-0049>
- Sirin A., Medvedeva M., Maslov A., Vozbrannaya A. Assessing the land and vegetation cover of abandoned fire hazardous and rewetted peatlands: comparing different multispectral satellite data // *Land*. 2018. V. 7 (2). P. 71. <https://doi.org/10.3390/land7020071>
- Sirin A.A., Medvedeva M.A., Makarov D.A. et al. Multispectral satellite-based monitoring of land cover change and associated fire reduction after large-scale peatland rewetting following the 2010 peat fires in Moscow region (Russia) // *Ecol. Engin.* 2020. V. 158. P. 106044. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.106044>
- Sirin A., Maslov A., Makarov D. et al. Assessing wood and soil carbon losses from a forest-peat fire in the boreonemoral zone // *Forests*. 2021a. V. 12 (7). P. 880. <https://doi.org/10.3390/f12070880>
- Sirin A., Medvedeva M., Minayeva T. et al. Addressing peatland rewetting in Russian Federation climate reporting // *Land*. 2021b. V. 10. P. 1200. <https://doi.org/10.3390/land10111200>
- Sirin A., Medvedeva M. Remote sensing mapping of peat-fire-burnt areas: identification among other wildfires // *Remote Sens.* 2022. V. 14. P. 194. <https://doi.org/10.3390/rs14010194>
- Tanneberger F., Tegetmeyer C., Busse S. et al. The peatland map of Europe // *Mires and Peat*. 2017. V. 19. Art. 22. P. 1–17. <https://doi.org/10.19189/MaP.2016.OMB.264>
- Tanneberger F., Joosten H., Moen A. et al. Mires in Europe – regional diversity, condition and protection // *Diversity*. 2021. V. 13 (8). P. 381. <https://doi.org/10.3390/d13080381>
- Tubiello F.N., Biancalani R., Salvatore M. et al. A worldwide assessment of greenhouse gas emissions from drained organic soils // *Sustainability*. 2016. № 8. Art. 371. P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/su8040371>
- Turetsky M.R., Benscoter B., Page S. et al. Global vulnerability of peatlands to fire and carbon loss // *Nat. Geosci.* 2015. V. 8. P. 11–14.
- Wilson D., Blain D., Couwenberg J. et al. Greenhouse gas emission factors associated with rewetting of organic soils // *Mires Peat*. 2016. V. 17. P. 1–28. <https://doi.org/10.19189/MaP.2016.OMB.222>
- Yu Z.C. Northern peatland carbon stocks and dynamics: a review // *Biogeosciences*. 2012. V. 9. P. 4071–4085. <https://doi.org/10.5194/bg-9-4071-2012>

Peatbogs and Anthropogenically Modified Peatlands: Carbon, Greenhouse Gases and Climate Change

A. A. Sirin*

Institute of Forest Science, Russian Academy of Sciences, Uspenskoye, Moscow Region, Russia

*e-mail: sirin@ilan.ras.ru

Peatlands play a special role in carbon sequestration, the formation of the gas composition of the atmosphere and related impacts on the climate. The features of peatland ecosystems, their distribution, diversity and current state, responses to climate change, their role as carbon reservoirs, as sources and sinks of greenhouse gases, and their changes in response to human impacts are considered. Opportunities for reducing greenhouse gas emissions from anthropogenically modified peatlands, the effectiveness of peatland rewetting and peatland restoration for climate change mitigation, and adaptation and sustainable management are shown.

Keywords: mires, peatlands, climate change, carbon, mitigation, adaptation, greenhouse gases

УДК 631.48:930.26

ОБЗОР ОСНОВНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ В ПОЧВАХ ЗОНАЛЬНОГО РЯДА ПО ДАННЫМ МЕТАГЕНОМНОГО АНАЛИЗА И ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *IN SITU*

© 2022 г. Д. А. Юршенас¹, *, Н. Н. Каширская¹¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
ФИЦ “Пушинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Московская обл., Россия*e-mail: dasha_ometova@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 23.06.2022 г.

Изучение таксономического разнообразия почвенной микробиоты имеет большое теоретическое значение для понимания структуры микробного сообщества и участия микроорганизмов в процессах почвообразования. До сих пор остается актуальным установление взаимосвязи микробного разнообразия с типом почвы и особенностями ландшафта. Цель исследования — обзор экологически значимых таксономических групп прокариот в почвах зонального ряда и сравнение результатов, полученных нами для южного чернозема методом FISH (fluorescence *in situ* hybridization), с литературными данными о таксономическом разнообразии микробных сообществ черноземов. Показано, что в почвах лесной зоны преобладают Proteobacteria, ответственные за разложение легкодоступного органического вещества, и Acidobacteria, способные утилизировать труднодоступное органическое вещество почвы в условиях низких значений pH. В степной зоне — с более теплым климатом и щелочными почвами — в качестве преобладающей группы гидролитического микробного комплекса выделялись Actinobacteria. Обнаружена отрицательная корреляция ($r = -0.77$) между величинами относительного обилия Actinobacteria и Proteobacteria в ряду зональных почв. В мерзлотных, лесных и степных почвах в ряде случаев отмечалось высокое относительное обилие Verrucomicrobia. В пустынных почвах доля этой таксономической группы не превышала 5%. В большинстве палеопочв различного возраста доля Verrucomicrobia была в 2–4 раза меньше, чем в современных почвах. Исследованный нами южный чернозем Воронежской обл. характеризовался повышенной долей Acidobacteria, низкой долей Actinobacteria и значительным сходством относительного обилия Archaea, Proteobacteria и Verrucomicrobia, по сравнению с данными, известными для южных черноземов. Проведенное исследование позволило обобщить полученные в последние десятилетия данные о распространении основных таксономических групп прокариот в почвах лесных и степных экосистем.

Ключевые слова: микробные сообщества, метагеном, таксономические группы, Archaea, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia

DOI: 10.31857/S0042132422060102

ВВЕДЕНИЕ

С 1880-х гг., когда Жан-Жак Шлезинг и Ахилл Мюнц впервые установили взаимосвязь процесса нитрификации с деятельностью почвенных микроорганизмов, и до настоящего времени продолжается развитие представлений о важнейшей роли почвенной микробиоты в процессах почвообразования (Омелянский, 1940). Число публикаций, посвященных таксономическому разнообразию почвенных микроорганизмов, неуклонно растет в последние десятилетия (Манучарова и др., 2020; Чернов, Железова, 2020; Wellington et al., 2003; Thomson et al., 2010; Delgado-Baquerizo et al., 2018). Анализ почвенного метагенома или рибо-

сомальной РНК *in situ* позволяет идентифицировать таксономические группы микроорганизмов, установить взаимосвязи между таксономической структурой и экологическими функциями микробного сообщества (Wellington et al., 2003), выявить место тех или иных таксономических групп в пищевых сетях и их участие в разложении органического вещества почвы. Изучение бактериального разнообразия на основе 16S рРНК позволило установить, что почва является одной из самых насыщенных прокариотами сред обитания на Земле. Несмотря на то, что сам ген 16S составляет примерно 0.05% среднего прокариотического генома, анализ этого участка рибосомальной

РНК дает ценную информацию о разнообразии микробных популяций (Steele, Streit, 2005). Идентификация 16S рРНК до сих пор остается мощным инструментом микробной экологии. Одним из эффективных современных методов является метод *in situ* гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами — FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) (Манучарова, 2010; Amann et al., 1995).

Однако, несмотря на огромное разнообразие прокариот, их значимые экологические группы в почвах нашей планеты составляют сравнительно немногочисленные фило типы, около 2% от общего разнообразия (Delgado-Baquerizo et al., 2018). Наиболее распространенные из этих фило типов относятся к следующим филумам: Alphaproteobacteria (*Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Rhodoplanes*), Betaproteobacteria (*Methylobium*, *Ramlibacter*), Acidobacteria (*Solibacter*), Actinobacteria (*Streptomyces*, *Salinibacterium*, *Mycobacterium*). К достаточно распространенным таксономическим группам почвенных микроорганизмов относятся также Verrucomicrobia. Несмотря на низкую частоту встречаемости представителей этого филума в большинстве исследований, целенаправленный поиск позволяет выявлять более 20% Verrucomicrobia в почвах (Чернов, 2016; Janssen, 2006; Hansel et al., 2008; Bergmann et al., 2011). Отдельную нишу в исследованиях микробного разнообразия почв занимают Archaea. Вклад этой группы прокариот в микробные сообщества различных местообитаний может варьировать от долей процента до половины всей численности, как это было показано для олиготрофных болот (Панкратов, 2007).

Соотношение основных таксономических групп характеризуется широкой изменчивостью даже в пределах одного почвенного типа. Так, в различных черноземах доли Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria и Verrucomicrobia варьировали соответственно в пределах 8–36% (Чернов и др., 2018; Манучарова и др., 2020), 4–11% (Манучарова и др., 2020; Горбачева, 2016), 15–35% (Горбачева, 2016; Мельничук и др., 2018), 1.4–21% (Мельничук и др., 2018; Чернов и др., 2018). На таксономическую структуру микробных сообществ существенно влияет состав растительности. При исследовании почв зонального ряда для учета различий таксономической структуры в пределах одной природной зоны необходимо принимать во внимание взаимосвязи между растениями и микроорганизмами.

Метаболические особенности представителей некоторых филогенетических групп нередко перекрываются, однако существует возможность установить их преимущественную экологическую роль, поскольку микроорганизмы различных групп, разлагающие органическое вещество почвы, вступают в процессы его переработки на

разных стадиях, с различной интенсивностью, играя свою роль в зависимости от условий среды. К существенным сезонным изменениям таксономической структуры микробных сообществ может приводить сельскохозяйственное использование почв. Так, в конце вегетации культуры увеличивается доля Actinobacteria, поскольку микробное сообщество нуждается в разрушении трудно гидролизующего органического вещества, накопившегося в виде пожнивных остатков. В середине вегетации на разных фазах роста растений могут доминировать другие группы. При этом использование удобрений увеличивает количество копитрофных и снижает долю олиготрофных микроорганизмов (Semenov, 2021).

В связи с множеством публикаций, посвященных таксономическому разнообразию микробных сообществ в почвах различных природных зон, появилась необходимость в обобщении и структуризации этих данных. Цель исследования — обзор экологически значимых таксономических групп прокариот в почвах зонального ряда и сравнительный анализ результатов, полученных нами для южного чернозема методом FISH, с данными о таксономическом разнообразии типичных и южных черноземов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистическую обработку данных по 40 почвам из 23 литературных источников проводили в программе Excel с помощью построения диаграмм box plot (Krzywinski, Altman, 2014) и в программе STATISTICA методом главных компонент.

Материал экспериментального исследования — верхний горизонт чернозема южного (Богучарский р-он Воронежской обл.). Образцы отбирались в июне 2021 г. В этом году почва после многолетней регулярной распашки впервые перестала использоваться. Начался переход пахотной почвы в залежное состояние. Растительное сообщество было представлено сурепкой *Barbarea vulgaris*, проективное покрытие составляло 100%. Проведена оценка относительного обилия метаболически активных клеток микроорганизмов различных таксономических групп с использованием рРНК-специфичных олигонуклеотидных зондов, меченых Су-3, в трех независимых повторностях (Манучарова, 2010): Archaea ARCH915, Alphaproteobacteria ALFlb, Betaproteobacteria BET42a, Actinobacteria HGC69a, Acidobacteria HoAc, Verrucomicrobia Ver138. При этом общую численность микробного сообщества почвы оценивали в тех же образцах с использованием акридина оранжевого. Статистическая обработка данных проводилась стандартными методами (Дмитриев, 1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Относительное обилие основных таксономических групп микробных сообществ в верхних горизонтах почв зонального ряда приведено в табл. 1.

Оценка таксономической структуры методом FISH проводилась в 10% выборки, остальные 90% результатов были получены с помощью метагеномного анализа.

Одна из самых распространенных микробных групп во многих почвах — Proteobacteria, что подтверждается как молекулярными методами, так и методами культивирования. Эта таксономическая группа в совокупности обладает широким спектром метаболических возможностей, включая копитрофных, метилотрофных, азотфиксирующих, сульфат- и железоредуцирующих бактерий (Zhang, Xu, 2008). Большинство представителей Proteobacteria относятся к копитрофам, участвующим в разложении легкодоступной органики (Eilers et al., 2010; Goldfarb et al., 2011).

В почвах зонального ряда выявлено широкое варьирование относительного обилия Proteobacteria (рис. 1).

В степных почвах доля Proteobacteria снижается, по сравнению с лесными почвами, до 14–36% в черноземах и до 12–31% в почвах зоны сухих степей. При этом в коричневой почве содержание Proteobacteria в микробном пуле выше, чем в каштановой почве, а средние и медианные величины этого показателя соответствуют солонцам. Широкий разброс относительного обилия Proteobacteria отмечен в почвах пустынь — от 25 до 51%. Здесь наиболее высокий процент этой группы выявлен в биогенных горизонтах пустынных почв Восточного Казахстана (Кутюва и др., 2015). Необходимо отметить, что механизмы адаптации к высыханию для большинства Proteobacteria до сих пор остаются неразгаданными, однако они нередко составляют высокую долю в микробном разнообразии пустынь (Heulin et al., 2017).

В отдельных случаях отмечаются низкие величины относительного содержания Proteobacteria — в темно-серой лесной почве Белгородской обл., в черноземе типичном Воронежской обл. (Чернов и др., 2018) и в почве пустыни Атакама в Чили (Neilson et al., 2012). В целом, тенденция снижения содержания Proteobacteria в микробных сообществах отмечена в зональном ряду от почв лесной зоны к почвам сухостепной зоны.

Обилие таксонов Proteobacteria обычно уменьшается с глубиной (Steger et al., 2019). Однако в микробных сообществах глубоких почвенных горизонтов известны случаи резкого увеличения доли этой таксономической группы. Так, в нижнем горизонте солонца на границе с почвообразующей породой их содержание в микробном пуле достигает почти 100% (Чернов, 2016). Эти данные согласуются с недавно полученными нами результатами

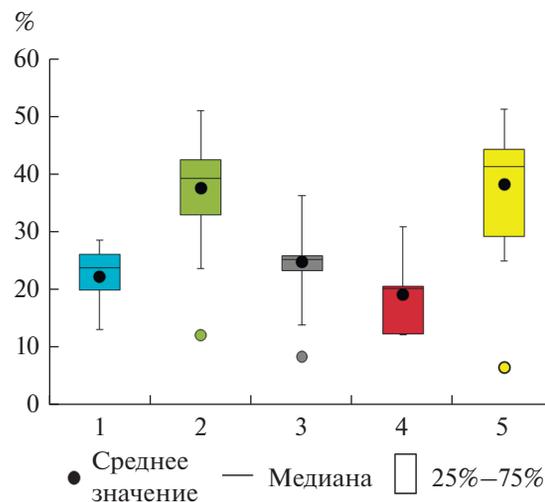


Рис. 1. Относительное обилие Proteobacteria в верхних горизонтах почв зонального ряда: 1 — вечномёрзлые почвы ($n = 4$), 2 — почвы лесной зоны ($n = 12$), 3 — черноземы ($n = 10$), 4 — почвы сухостепной зоны ($n = 7$), 5 — пустынные почвы ($n = 6$).

о значительном увеличении доли сапротрофных микроорганизмов с глубиной в современных и погребенных почвах (Юршенас, Каширская, 2022). Кроме того, высокое обилие Proteobacteria в глубоких горизонтах почв может быть связано с разнообразием этой группы и присутствием среди ее представителей сульфат- и железоредуцирующих бактерий. Известно, что в поверхностных горизонтах преобладают Alphaproteobacteria, а в более глубоких слоях — Betaproteobacteria (Steger et al., 2019). Отмечены случаи увеличения относительного обилия Betaproteobacteria в нарушенных почвах (Кондакова, 2019; Labbé et al., 2007). Считается, что представители данной группы могут вести себя как олиготрофы.

Следующая экологически значимая группа микроорганизмов, имеющая повсеместное распространение в почвах Земного шара, — Acidobacteria. Большинство представителей этой группы — ацидофильные хемогетеротрофы, растущие аэробно в мезофильных условиях (Zhang, Xu, 2008), они связаны с трансформацией органического вещества почвы (Banerjee et al., 2016). Acidobacteria принимают участие в регуляции биогеохимических циклов, секретируют экзополисахариды и стимулируют рост растений (Kalam et al., 2020). Они активно участвуют в утилизации труднодоступного органического вещества, образующегося при отмирании растений, грибов и насекомых (Kalam et al., 2020). Некоторые представители Acidobacteria, синтезируя широкий спектр гликозидгидролаз, способны к расщеплению сложных углеводных полимеров: ксилана, целлюлозы, гемицеллюлозы, пектина, крахмала и хитина (Ward et al., 2009; Belova et al., 2018). Исследования предполагают

Таблица 1. Относительное обилие Proteobacteria (1), Acidobacteria (2), Actinobacteria (3) и Verrucomicrobia (4) в верхних горизонтах некоторых зональных и интразональных почв

Почва (источник)	Растительность	pH	Относительное обилие таксономических групп, %			
			1	2	3	4
FISH						
Почва тундры, Сибирь (Гродницкая и др., 2017; Kobabe et al., 2004)	Мхи, осоки	7.8–8.2	13.0	–	–	–
Торфяная почва, Тверская обл. (Конова, 2013)	Мхи, разнотравье	–	20.0	–	14.0	–
Дерново-луговая почва, Московская обл. (Конова, 2013)	Злаки, разнотравье	–	39.0	26.0	–	–
Чернозем типичный, Воронежская обл. (Манучарова и др., 2020)	Древесная растительность (<i>Quercus robur</i> , <i>Acer</i> sp.)	7.5	36.0	4.0	28.0	4.0
Метагеном						
Вечномёрзлые почвы						
Почвы Антарктиды (Rinnan et al., 2009; Yergeau et al., 2012)	<i>Empetrum rubrum</i> , <i>Poa annua</i> , <i>Usnea antarctica</i>	4.8	–	25.0	29.7	10.0
Арктическая почва, Шпицберген (Schostag et al., 2015)	<i>Salix polaris</i> , <i>Luzula arguata</i>	4.6–5.6	22.0	17.0	22.0	20.0
Торфяная почва, Большеземельская тундра (Лаптева и др., 2017)	<i>Betula nana</i> , <i>Ledum decumbens</i> , <i>Cladonia</i> sp.	2.6–3.4	28.0	30.0	29.0	3.0
Почвы лесной зоны						
Почва бореального леса, Финляндия (Sietjö et al., 2019)	Хвойный лес (<i>Pinus sylvestris</i>)	4.1	39.6	26.6	16.5	4.0
Лесная почва, Чехия (Lladó et al., 2016)	Хвойный лес (<i>Picea abies</i>)	–	45.0	38.0	5.7	4.3
Дерново-подзолистая почва, Чувашия (Чернов и др., 2018)	Смешанный хвойно-широколиственный лес	–	26.3	11.3	16.5	29.8
Дерново-подзолистая почва, Московская обл. (Чернов, 2016)	Смешанный елово-широколиственный лес	6.7	42.3	9.1	24.0	3.2
Дерново-подзолистая почва, Московская обл. (Zhelezova et al., 2022)	Смешанный елово-широколиственный лес	–	42.0	19.0	–	–
Серая лесная почва, Московская обл. (Чернов, 2016)	Широколиственный лес	5.5	50.6	7.0	24.6	6.0
Темно-серая почва, Белгородская обл. (Чернов и др., 2018)	Широколиственный лес (<i>Tilia</i> sp., <i>Quercus</i> sp.)	5.5	12.0	7.0	11.5	22.8
Темно-серая лесная почва, Красноярский край (Кондакова, 2019)	Смешанный лес (<i>Pinus</i> sp., <i>Betula</i> sp.)	5.6	23.5	–	8.0	4.3

Таблица 1. Продолжение

Почва (источник)	Растительность	рН	Относительное обилие таксономических групп, %			
			1	2	3	4
Темно-серая лесная нарушенная почва (Кондакова, 2019)	Смешанный лес (<i>Pinus</i> sp., <i>Betula</i> sp.)	5.6	15.8	–	10.0	5.4
Лесная почва в горах Китая (Chen et al., 2021)	Альпийский лес (<i>Picea crassifolia</i>)	7.35	34.4	17.6	21.7	2.6
Черноземы						
Чернозем типичный, пашня, Воронежская обл. (Чернов, 2016)	Агроценоз (<i>Triticum aestivum</i>)	6.6	26.2	9.2	24.3	6.1
Чернозем типичный, пашня, Воронежская обл. (Чернов и др., 2018)	Агроценоз (<i>Triticum aestivum</i>)	–	8.3	5.3	18.5	21.0
Чернозем типичный, пашня, Курская обл. (Горбачева, 2016)	Агроценоз (<i>Triticum aestivum</i>)	–	25.5	11.0	15.0	–
Чернозем, целина, Курская обл. (Проценко и др., 2012; Горбачева, 2016)	Ковыльная степь (<i>Stipa pennata</i>)	5.3	21.6	0.9	17.0	–
Чернозем типичный, Курская обл. (Семенов и др., 2020)	Ковыльная степь (<i>Stipa pennata</i>)	7.1	13.7	10.0	20.0	20.9
Чернозем южный, пашня, Крым (Мельничук и др., 2018)	Агроценоз (<i>Triticum aestivum</i> , <i>Sorghum bicolor</i>)	–	25.6	7.1	34.0	4.4
Чернозем южный, целина, Крым (Мельничук и др., 2018)	Типчаково-ковыльная степь (<i>Festuca</i> sp., <i>Stipa</i> sp.)	–	23.1	5.4	35.4	1.4
Почвы сухих степей						
Каштановая почва, Прикаспий (Чернов, 2016)	Типчак, польнь (<i>Festuca</i> sp., <i>Artemisia</i> sp.)	7.3	12.2	5.6	44.8	3.6
Коричневая почва, Крым (Чернов, 2016)	Ксерофитный лес (<i>Juniperus</i> sp.)	7.3	30.6	6.0	48.4	4.3
Почвы пустынь						
Восточный Казахстан (Кутовая и др., 2015)	Пустынная растительность (<i>Ilynia regelii</i>), крайнеаридная почва на засоленных пролювиальных отложениях (Solonchak)	8.7–9.1	43.9	1.2	9.5	1.1
Восточный Казахстан (Кутовая и др., 2015)	Пустынная растительность (<i>Ilynia regelii</i>), крайнеаридная почва на незасоленных гипсоносных пролювиальных отложениях (Gypsisol)	8.8–8.9	50.8	2.0	10.0	3.0

Таблица 1. Окончание

Почва (источник)	Растительность	рН	Относительное обилие таксономических групп, %			
			1	2	3	4
Пустыня Табернас, Испания (Maier et al., 2014)	Пустынная растительность (<i>Psora desipiens</i>)	7.1–7.4	24.8	3.8	–	3.4
Пустыня Атакама, Чили (Neilson et al., 2012) рН	Пустынная растительность (<i>Cistanthe salsoloides</i>)	7.9–8.1	6.4	0.3	77.0	–
Пустыня Сахара, г. Тагавин, Тунис (Chanal et al., 2006)	–	–	41.0	17.0	25.0	–
Субтропические почвы						
Китай, провинция Фуцзянь, чайная плантация 0 лет (Li et al., 2016)	Агроценоз (<i>Camellia sinensis</i>)	5.1	33.3	26.7	11.7	–
Китай, провинция Фуцзянь, чайная плантация 10 лет (Li et al., 2016)	Агроценоз (<i>Camellia sinensis</i>)	3.8	47.3	20.7	11.7	–
Китай, пшенично-рисовое поле (Wang et al., 2016)	Агроценоз (<i>Triticum aestivum</i> , <i>Oryza sativa</i>)	5.0–6.6	34.0	8.8	5.9	–
Инграциональные почвы						
Лугово-каштановая, Прикаспийская низменность (Тихонович и др., 2018)	Злаки, разнотравье	6.2	12.0	–	–	–
Солонец, Прикаспийская низменность (Чернов, 2016)	Типчак, польнь (<i>Festuca</i> sp., <i>Artemisia</i> sp.)	7.2	20.4	6.2	31.8	7.9
Палеопочвы						
Дерново-подзолистая почва, 2 тыс. л. н. (Чернов и др., 2018)	–	–	23.5	6.0	17.5	0.5
Темно-серая почва, 2.6–2.4 тыс. л. н. (Чернов и др., 2018)	–	–	15.3	13.5	22.8	0.9
Чернозем, 3.7–3.5 тыс. л. н. (Чернов и др., 2018)	–	–	15.0	7.0	27.5	1.3
Чернозем, 33–24 тыс. л. н. (Семенов и др., 2020)	–	7.6	–	–	–	1.5
Чернозем, 105–95 тыс. л. н. (Семенов и др., 2020)	–	8.1	–	–	32.7	0.7
Чернозем, 130–117 тыс. л. н. (Семенов и др., 2020)	–	7.6	–	20.0	9.0	21.0

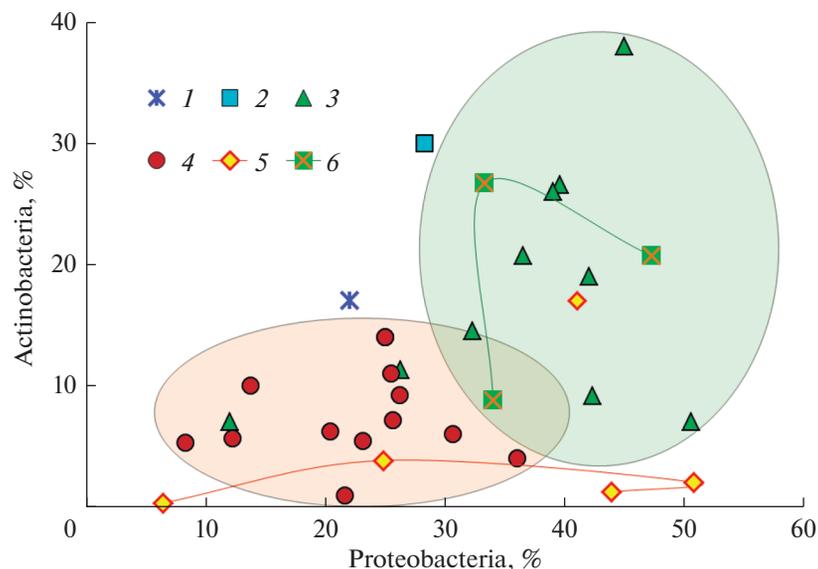


Рис. 2. Соотношение Proteobacteria и Acidobacteria в верхних горизонтах почв зонального ряда: 1 – арктическая почва, 2 – торфяная почва тундры, 3 – лесные почвы, 4 – степные почвы, 5 – почвы пустынь, 6 – субтропические почвы.

взаимосвязь генных модулей, кодирующих эти ферменты, с устойчивостью Acidobacteria к высыханию. Все культивируемые Acidobacteria являются граммотрицательными, не образуют спор и демонстрируют олиготрофный способ питания. Отсутствие роста на обычных питательных средах у большинства представителей данной группы может быть связано с их олиготрофной природой или экологической К-стратегией (Ward et al., 2009).

На рис. 2 представлено соотношение Proteobacteria и Acidobacteria в верхних горизонтах почв зонального ряда. В почвах лесных экосистем относительное обилие как Proteobacteria, так и Acidobacteria, было в большей части случаев заметно выше, чем в степных почвах. Это может быть связано с преобладанием процессов разложения органического вещества в лесных почвах, тогда как почвы степной зоны характеризуются большей интенсивностью накопления органики, высокой емкостью катионного обмена и формированием почвенных микроагрегатов. Установлено, что в микроагрегатах представители Acidobacteria содержатся в меньшем количестве, по сравнению с макроагрегатами (Mummey et al., 2006).

Преобладание Acidobacteria отмечено в микробных сообществах субтропических почв чайных плантаций Китая (Li et al., 2016). Известно, что в тропических почвах с недостатком питательных веществ представители Acidobacteria получают преимущество, благодаря высокой способности адаптироваться к разложению сложных субстратов (Ward et al., 2009).

Пустынные почвы в большей части случаев характеризовались широким варьированием отно-

сительного обилия Proteobacteria и низкими величинами доли Acidobacteria, за исключением почвы пустыни Сахара, где доля последних достигала 17%.

Важную роль в процессах минерализации почвенного органического вещества играют Actinobacteria, способные разлагать различные его формы, включая труднодоступные. В этом аспекте Actinobacteria могут выполнять ту же экологическую функцию, что и рассмотренная ранее группа Acidobacteria, но преимущество они получают при других условиях. Большинство представителей Actinobacteria предпочитают значения pH = 6–9 и умеренную температуру – 25–30°C. Богатые органическим веществом щелочные почвы оптимальны для их развития (Hazarika, Thakur, 2020). В зональном ряду при снижении кислотности и увеличении температуры почв доля Actinobacteria увеличивается с уменьшением доли Acidobacteria.

Поиск взаимосвязи между относительным обилием Actinobacteria и Proteobacteria в верхних горизонтах почв зонального ряда представлен на рис. 3. Эти таксономические группы показали здесь отрицательную корреляцию с коэффициентом $r = -0.77$. Наибольшее содержание Actinobacteria и наименьшее – Proteobacteria отмечено в почве пустыни Атакама в Чили, которая известна как самая сухая пустыня земного шара (Neilson et al., 2012). Почва отличается высоким pH и достаточно развитым растительным покровом, представленным преимущественно *Cistanthe sal-soioides*. Подобные условия приемлемы для устойчивых к высыханию, способных к образованию спор представителей Actinobacteria, относительное обилие которых здесь достигает 77%. Известно, что устойчивость микроорганизмов к обезво-

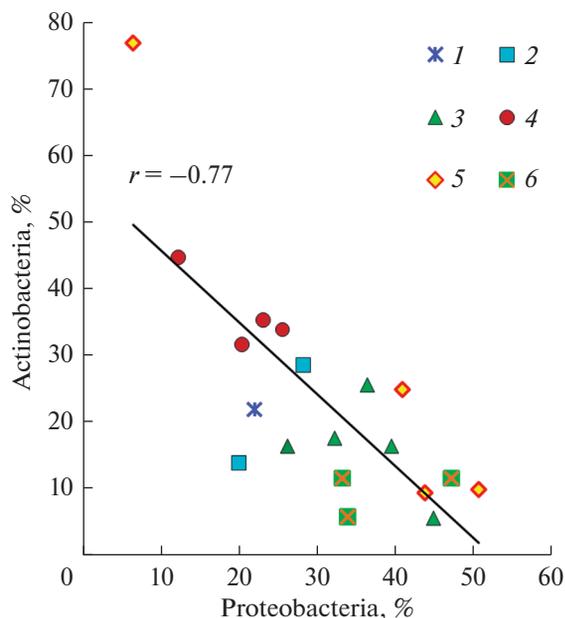


Рис. 3. Взаимосвязь относительного обилия Proteobacteria и Actinobacteria в верхних горизонтах почв зонального ряда: 1 – арктическая почва, 2 – торфяная почва тундры, 3 – лесные почвы, 4 – степные почвы, 5 – почвы пустынь, 6 – субтропические почвы.

живанию – наиболее существенный адаптивный признак для засушливых местообитаний (Heulin et al., 2017). Кроме того, преобладание Actinobacteria в почвах, растительный покров которых представлен ксерофитами, связано с их способностью перерабатывать труднодоступное органическое вещество.

Увеличение относительного обилия Actinobacteria в микробном сообществе, сопровождающееся уменьшением доли Proteobacteria, наблюдается в щелочных почвах степной зоны. В лесных и вечномёрзлых почвах с низкими значениями рН доля Actinobacteria уменьшается, поскольку преимущество здесь получают другие представители гидролитического микробного комплекса. Наименьшие значения относительного обилия Actinobacteria на фоне высокого обилия Proteobacteria отмечены в лесной почве Чехии (Lladó et al., 2016), пустынных почвах Казахстана (Кутюва и др., 2015) и кислых тропических почвах Китая (Li et al., 2016; Wang et al., 2016).

В погребенных палеопочвах содержание Actinobacteria в некоторых случаях сохраняется на уровне выше 30% от общего пула микроорганизмов (Семенов и др., 2020). В коллювиальных почвах Южной Моравии, Чешская Республика наибольшее их относительное обилие отмечено на глубине 250–350 см в погребенном гумусовом горизонте палеочернозема (Sagova-Mareckova et al., 2016). По-видимому, рассматриваемый горизонт изначально был богат органическим веществом,

обеспечившим высокую исходную численность этой характерной для черноземов группы гидролитического микробного комплекса. С другой стороны, доля Actinobacteria нередко увеличивается с глубиной, поскольку они способны к олиготрофному способу питания. Закономерные изменения в зависимости от глубины почвенного слоя для Actinobacteria обычно не выявляются (Eilers et al., 2012).

Свидетельства широкого распространения и многочисленности Verrucomicrobia в почвах указывают на значимую роль этих микроорганизмов, хотя конкретная экологическая их функция до сих пор не установлена (Zhang, Xu, 2008). Доля представителей этого филума в микробных сообществах современных почв редко превышает 5%, однако существует вероятность значительной их недооценки, поскольку большинство используемых праймеров не обеспечивают в достаточной мере амплификацию генов 16S рРНК Verrucomicrobia (Bergmann et al., 2011). Долгое время считалось, что они олиготрофны и могут расти при низкой доступности углерода (Eilers et al., 2012). Выявлено увеличение относительного обилия данной группы с повышением концентраций нитратного и аммонийного азота, что подтверждает идею о способности развиваться при низких концентрациях углерода, используя для получения энергии неорганические соединения (Steger et al., 2019). Тем не менее, методом метабаркодинга показана взаимосвязь большей части Verrucomicrobia с верхними горизонтами почвы, что указывает на их потребность в высоком содержании органического вещества (Семенов и др., 2020). В пахотных почвах, в ответ на снижение содержания органического углерода после вспашки, численность Verrucomicrobia резко уменьшается (Semenov, 2021).

На рис. 4 представлено относительное обилие Verrucomicrobia в верхних горизонтах современных почв зонального ряда и в погребенных почвах. Среди вечномёрзлых почв данные по относительному обилию Verrucomicrobia получены для торфяной почвы Большеземельской тундры (Лаптева и др., 2017), антарктической почвы Фолклендских островов (Yergeau et al., 2012) и арктической почвы Шпицбергена (Schostag et al., 2015). Значения этого показателя составляют здесь 3, 10 и 20% соответственно. В современных лесных, степных и пустынных почвах относительное обилие Verrucomicrobia, как правило, варьирует в близком диапазоне от 1.1 до 7.9%. В палеопочвах представленность этой таксономической группы снижается в 2–4 раза, по сравнению с современными почвами. При этом Verrucomicrobia – индикаторы разновозрастных погребенных палеопочв, где их распространённость в ряде случаев на порядок ниже, чем в современных почвах (Чернов и др., 2018). Однако единичные случаи экстремально высоких величин относительного обилия Verrucomicrobia в пределах 20–30% отмечены

как в современных почвах, так и в погребенных палеопочвах.

Сравнительный анализ относительного обилия четырех таксономических групп в микробных сообществах верхних горизонтов лесных и степных почв проводился с помощью метода главных компонент (рис. 5). На диаграмме рассеяния представлены 81.7% различий между шестнадцатью вариантами, семь из которых относятся к степным почвам и девять — к почвам лесной зоны. К группе лесных почв отнесены две палеопочвы, погребенные 2 тыс. л. н. и 2.6–2.4 тыс. л. н., к группе степных почв — одна палеопочва, погребенная 3.7–3.5 тыс. л. н. Увеличение доли *Acidobacteria* смещает координаты на факторной плоскости в положительном направлении по оси O_x (фактор 1), а увеличение доли *Verrucomicrobia* — в положительном направлении по оси O_y (фактор 2). Умеренная положительная корреляция с коэффициентом 0.5 выявлена между группами *Acidobacteria* и *Proteobacteria*, умеренная отрицательная корреляция с коэффициентом -0.6 — между группами *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. Увеличение относительного обилия *Proteobacteria* смещает координаты в положительном направлении по фактору 1 и в отрицательном — по фактору 2, а рост относительного обилия *Actinobacteria* — в отрицательном направлении по обоим осям.

Таким образом, для большинства почв лесной зоны характерны высокие показатели *Acidobacteria* и *Proteobacteria*, а в степных почвах преобладающая группа — *Actinobacteria*. Значительное увеличение *Verrucomicrobia* отмечено в единичных случаях как в лесных, так и в степных почвах. Палеопочвы характеризуются низким содержанием *Verrucomicrobia*, по сравнению с большей частью современных почв.

На рис. 6 представлены результаты экспериментальной работы: численность и относительное обилие основных таксономических групп микробного сообщества в черноземе южном Богучарского р-на Воронежской обл. Общая численность микробных клеток, окрашенных акридином оранжевым, достигает в верхнем горизонте 3.42×10^8 кл./г. Гибридизация с олигонуклеотидными зондами позволяет выявить около 60% микробного сообщества. Численность отдельных таксономических групп варьирует от 0.14×10^8 до 0.59×10^8 кл./г. Максимальную долю микробного сообщества представляют *Alphaproteobacteria* — 17%, а минимальную — *Verrucomicrobia* — 4% от общей численности микробных клеток, окрашенных акридином оранжевым. Сумма *Alphaproteobacteria* и *Betaproteobacteria* составляет 26%, что согласуется с результатами по обилию *Proteobacteria* в южных черноземах, где, по данным метагеномного анализа, эта группа микроорганизмов варьирует в пределах 23–26%, увеличиваясь

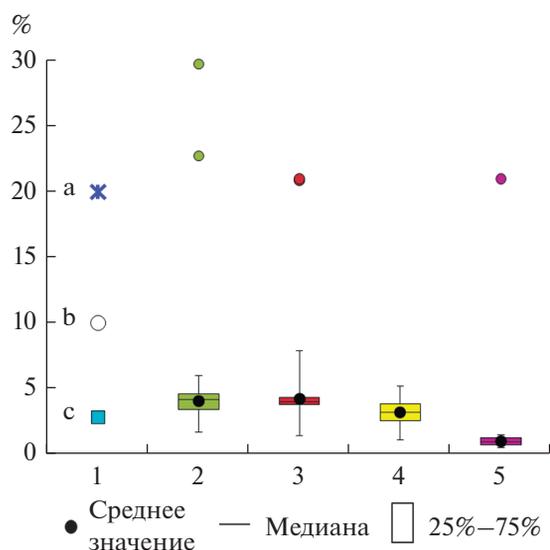


Рис. 4. Относительное обилие *Verrucomicrobia* в верхних горизонтах почв зонального ряда и погребенных почв: 1 — вечномёрзлые почвы (а — арктическая почва, b — почва Антарктиды, c — торфяная почва тундры) ($n = 3$), 2 — почвы лесной зоны ($n = 10$), 3 — почвы степной зоны ($n = 9$), 4 — пустынные почвы ($n = 5$), 5 — погребенные почвы ($n = 6$).

при оптимальной сельскохозяйственной обработке (Мельничук и др., 2018).

Значительную долю микробного сообщества — 13% составляют *Acidobacteria*, что наиболее близко к значению, обнаруженному в верхнем слое пахотного чернозема Курской обл. (Горбачева, 2016), где содержание данной группы достигает 11%. В пахотных почвах варьирование численности *Actinobacteria* и *Acidobacteria* может быть обусловлено сезонными изменениями. В конце вегетации культуры преобладание какой-либо из этих групп гидролитического микробного комплекса, принимающих участие в утилизации пожнивных остатков, зависит от pH и температуры почвы. Зима 2020/2021 гг. признана самой холодной за последние 10 лет, а исследуемый нами чернозем южный только в 2021 г. начал переход из состояния пахотной почвы в залежное. Здесь могла сохраниться высокая доля *Acidobacteria*, поскольку их представители более устойчивы к низким температурам, по сравнению с *Actinobacteria*, доля которых, по данным нашего исследования составляет 8%, что в 2–4.5 раза меньше, чем в черноземах, исследованных ранее (Горбачева, 2016; Мельничук и др., 2018). При этом значения относительного обилия *Archaea* и *Verrucomicrobia* составляют 8 и 4% соответственно, подтверждая данные метагеномного анализа, полученные для южных черноземов (Мельничук и др., 2018).

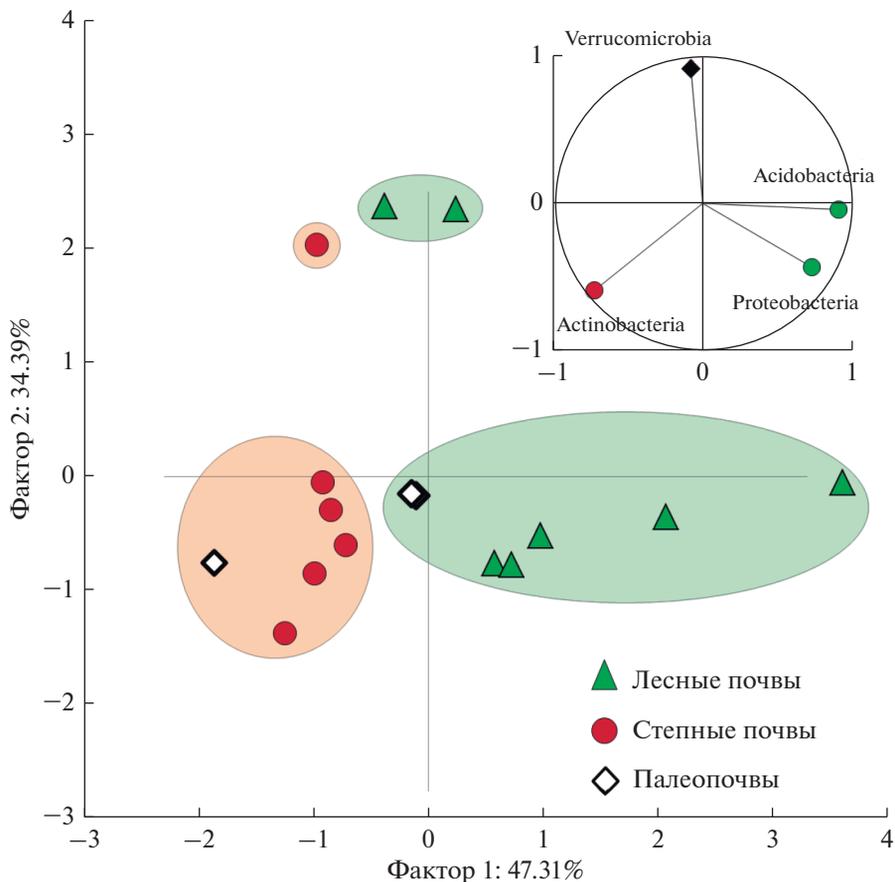


Рис. 5. Анализ содержания Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria и Verrucomicrobia в микробных сообществах верхних горизонтов лесных ($n = 8$) и степных ($n = 7$) почв с помощью метода главных компонент.

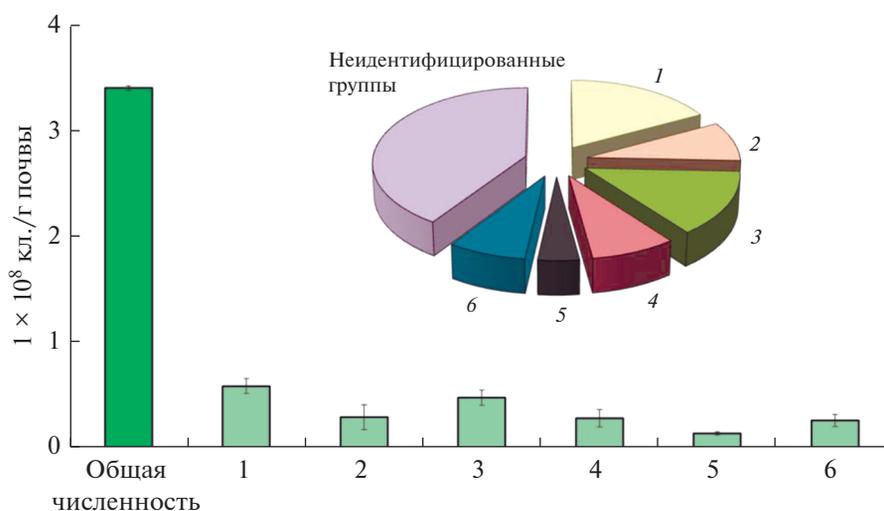


Рис. 6. Численность и относительное обилие таксономических групп микробного сообщества в верхнем слое южного чернозема Богучарского р-на Воронежской обл.: 1 – Alphaproteobacteria, 2 – Betaproteobacteria, 3 – Acidobacteria, 4 – Actinobacteria, 5 – Verrucomicrobia, 6 – Archaea.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщение данных по содержанию экологически значимых таксономических групп микробных сообществ в верхних горизонтах зональных почв выявило различия между почвами лесных и степных экосистем. В почвах лесной зоны преобладают Proteobacteria, принимающие участие в разложении легкодоступного органического вещества, и Acidobacteria, способные усваивать труднодоступное органическое вещество при низких значениях pH. В степной зоне с более теплым климатом и щелочными почвами в качестве преобладающей группы гидrolитического микробного комплекса выделены Actinobacteria.

В ряду зональных почв выявлена отрицательная корреляция с коэффициентом $r = -0.77$ между величинами относительного обилия Actinobacteria и Proteobacteria. При этом для обеих групп отмечена высокая устойчивость к засушливым условиям.

Хотя случаи экстремально высокого содержания Verrucomicrobia наблюдаются как в современных почвах, так и в палеопочвах, для большей части палеопочв различного возраста характерно существенное уменьшение относительного обилия данной группы, по сравнению с современными почвами.

В южном черноземе Богучарского р-на Воронежской обл. выявлены повышенная доля Acidobacteria и низкая доля Actinobacteria. По-видимому, баланс между этими двумя таксономическими группами здесь еще не успел восстановиться после длительного периода сельскохозяйственного использования и холодной зимы. При этом относительное обилие Archaea, Verrucomicrobia и Proteobacteria показывают значительное сходство с результатами метагеномных исследований южных черноземов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-18-00406.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Горбачева М.А. Анализ микробиома чернозема в России // С.-х. науки агропром. компл. на рубеже веков. 2016. № 17. С. 6–11.

Гродницкая И.Д., Сорокин Н.Д., Евграфова С.Ю. и др. Микробиологическая трансформация углерода CH_4 и CO_2 в криогенных почвах тундровых и лесных экосистем Сибири // Лесоведение. 2017. № 2. С. 111–127.

Дмитриев Е.А. Математическая статистика в почвоведении. М.: МГУ, 1995. 320 с.

Кондакова О.Э. Использование микроорганизмов для выращивания хвойных и улучшения биогенности почв в лесных питомниках Сибири: Дис... канд. биол. наук. Томск: ТГУ, 2019. 257 с.

Конова И.А. Наночастицы бактерий в некоторых почвах России: Дис... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2013. 119 с.

Кутюва О.В., Лебедева М.П., Тхакахова А.К. и др. Метагеномная характеристика биологического разнообразия крайнеаридных пустынных почв Казахстана // Почвоведение. 2015. № 5. С. 554. <https://doi.org/10.7868/S0032180X15050044>

Лантева Е.М., Виноградова Ю.А., Чернов Т.И. и др. Структура и разнообразие почвенных микробных сообществ в бугристых болотах северо-запада Большеземельской тундры // Изв. Коми НЦ УРО РАН. 2017. № 4 (32). С. 5–14.

Манушарова Н.А. Молекулярно-биологические аспекты исследований в экологии и микробиологии. М.: МГУ, 2010. 47 с.

Манушарова Н.А., Ксенофонтова Н.А., Каримов Т.Д. и др. Изменение филогенетической структуры метаболически активного прокариотного комплекса почв под влиянием нефтяного загрязнения // Микробиология. 2020. Т. 89. № 2. С. 222–234. <https://doi.org/10.31857/S0026365620020093>

Мельничук Т.Н., Абдурашитов С.Ф., Андронов Е.Е. и др. Изменение состава микробиома чернозема южного при влиянии систем земледелия и микробных препаратов // Таврич. вестн. агр. науки. 2018. № 4. С. 76–87. <https://doi.org/10.25637/TVAN2018.04.08>

Омелянский В.Л. Краткий курс общей и почвенной микробиологии. М.: Гос. изд-во, 1929. 184 с.

Панкратов Т.А. Бактериальные сообщества сфагновых болот и их участие в деструкции природных полимеров: Дис... канд. биол. наук. М.: ИНМИ РАН, 2007. 137 с.

Проценко А.А., Кузнецов А.Е., Миронов С.Ю. и др. Влияние режимов использования на свойства черноземов Центрально-Черноземного заповедника им. В.В. Алехина // Пробл. регион. экол. 2012. № 4. С. 23–26.

Семенов М.В., Чернов Т.И., Железова А.Д. и др. Микробные сообщества межледниковых и интерстадиальных палеопочв позднего плейстоцена // Почвоведение. 2020. № 6. С. 716–725. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20060106>

Тихонович И.А., Чернов Т.И., Железова А.Д. и др. Таксономическая структура прокариотных сообществ почв разных биоклиматических зон // Бюл. Почв. инст. им. В.В. Докучаева. 2018. № 95. С. 125–153. <https://doi.org/10.19047/0136-1694-2018-95-125-153>

Чернов Т.И. Метагеномный анализ прокариотных сообществ профилей почв европейской части России: Дис... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2016. 111 с.

Чернов Т.И., Железова А.Д. Динамика микробных сообществ почвы в различных диапазонах времени (обзор) // Почвоведение. 2020. № 5. С. 590–600. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20050044>

- Чернов Т.И., Железова А.Д., Кутовая О.В. и др. Сравнительная оценка структуры микробиомов погребенных и современных почв при помощи анализа микробной ДНК // *Микробиология*. 2018. Т. 87. № 6. С. 737–746.
<https://doi.org/10.1134/S0026365618060071>
- Юриенас Д.А., Каширская Н.Н. Динамика экологотрофической структуры микробных сообществ в профиле подкурганного чернозема эпохи бронзы и современного фонового чернозема // *Мат. Междунар. науч. конф. “XXV Докучаевские молодежные чтения”, посвященной 95-летию Почвенного института им. В.В. Докучаева и 100-летию кафедры почвоведения СПбГУ “Почва – жизнь”* (1–3 марта 2022, СПб.). СПб., 2022. С. 167–169.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59 (1). P. 143–169.
- Banerjee S., Kirkby C.A., Schmutter D. et al. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil // *Soil Biol. Biochem.* 2016. V. 97. P. 188–198.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.03.017>
- Belova S.E., Ravin N.V., Pankratov T.A. et al. Hydrolytic capabilities as a key to environmental success: chitinolytic and cellulolytic Acidobacteria from acidic sub-arctic soils and boreal peatlands // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2775.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02775>
- Bergmann G.T., Bates S.T., Eilers K.G. et al. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities // *Soil Biol. Biochem.* 2011. V. 43 (7). P. 1450–1455.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.03.012>
- Chanal A., Chapon V., Benzerara K. et al. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8 (3). P. 514–525.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00921.x>
- Chen L.F., He Z.B., Zhao W.Z. et al. Empirical evidence for microbial regulation of soil respiration in alpine forests // *Ecol. Indicat.* 2021. V. 126. P. 107710.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107710>
- Delgado-Baquerizo M., Oliverio A.M., Brewer T.E. et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil // *Science*. 2018. V. 359 (6373). P. 320–325.
<https://doi.org/10.1126/science.aap9516>
- Eilers K.G., Lauber C.L., Knight R., Fierer N. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil // *Soil Biol. Biochem.* 2010. V. 42 (6). P. 896–903.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.02.003>
- Eilers K.G., Debenpor S., Anderson S., Fierer N. Digging deeper to find unique microbial communities: the strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil // *Soil Biol. Biochem.* 2012. V. 50. P. 58–65.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.03.011>
- Goldfarb K.C., Karaoz U., Hanson C.A. et al. Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance // *Front. Microbiol.* 2011. № 2. P. 94.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00094>
- Hansel C.M., Fendorf S., Jardine P.M., Francis C.A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74 (5). P. 1620–1633.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01787-07>
- Hazarika S.N., Thakur D. Actinobacteria. Ch. 21 // *Beneficial microbes in agro-ecology. Bacteria and fungi* / Eds N. Amarean, M.S. Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, A. Sankaranarayanan. L.: Elsevier, 2020. P. 443–476.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823414-3.00021-6>
- Heulin T., Luca G.D., Barakat M. et al. Bacterial adaptation to hot and dry deserts // *Adaption of microbial life to environmental extremes* / Eds H. Stan-Lotter, S. Fendrihan Cham: Springer, 2017. P. 75–98.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-48327-6_4
- Janssen P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72 (3). P. 1719–1728.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>
- Kalam S., Basu A., Ahmad I. et al. Recent understanding of soil Acidobacteria and their ecological significance: a critical review // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 580024.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>
- Kobabe S., Wagner D., Pfeiffer E.M. Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence *in situ* hybridisation // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004. V. 50 (1). P. 13–23.
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.05.003>
- Krzywinski M., Altman N. Visualizing samples with box plots // *Nat. Methods*. 2014. V. 11 (2). P. 119–120.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2813>
- Labbé D., Margesin R., Schinner F. et al. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated Alpine soils // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007. V. 59 (2). P. 466–475.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00250.x>
- Li Y.C., Li Z., Li Z.W. et al. Variations of rhizosphere bacterial communities in tea (*Camellia sinensis* L.) continuous cropping soil by high-throughput pyrosequencing approach // *J. Appl. Microbiol.* 2016. V. 121 (3). P. 787–799.
<https://doi.org/10.1111/jam.13225>
- Lladó S., Žifčáková L., Větrovský T. et al. Functional screening of abundant bacteria from acidic forest soil indicates the metabolic potential of Acidobacteria subdivision 1 for polysaccharide decomposition // *Biol. Fertil. Soils*. 2016. V. 52 (2). P. 251–260.
<https://doi.org/10.1007/s00374-015-1072-6>
- Maier S., Schmidt T.S., Zheng L. et al. Analyses of dryland biological soil crusts highlight lichens as an important regulator of microbial communities // *Biodiv. Conserv.* 2014. V. 23 (7). P. 1735–1755.
<https://doi.org/10.1007/s10531-014-0719-1>
- Mummey D., Holben W., Six J., Stahl P. Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils // *Microb. Ecol.* 2006. V. 51 (3). P. 404–411.
<https://doi.org/10.1007/s00248-006-9020-5>
- Neilson J.W., Quade J., Ortiz M. et al. Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile // *Extremophiles*. 2012. V. 16 (3). P. 553–566.
<https://doi.org/10.1007/s00792-012-0454-z>
- Rinnan R., Rousk J., Yergeau E. et al. Temperature adaptation of soil bacterial communities along an Antarctic climate gradient: predicting responses to climate warming // *Glob. Change Biol.* 2009. V. 15 (11). P. 2615–2625.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01959.x>

- Sagova-Mareckova M., Zádorová T., Penížek V. et al.* The structure of bacterial communities along two vertical profiles of a deep colluvial soil // *Soil Biol. Biochem.* 2016. V. 101. P. 65–73.
https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.06.026
- Schostag M., Stibal M., Jacobsen C.S. et al.* Distinct summer and winter bacterial communities in the active layer of Svalbard permafrost revealed by DNA- and RNA-based analyses // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 399.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00399
- Semenov M.V.* Metabarcoding and metagenomics in soil ecology research: achievements, challenges, and prospects // *Biol. Bull. Rev.* 2021. V. 11 (1). P. 40–53.
https://doi.org/10.1134/S2079086421010084
- Sietiö O.M., Santalahti M., Putkinen A. et al.* Restriction of plant roots in boreal forest organic soils affects the microbial community but does not change the dominance from ectomycorrhizal to saprotrophic fungi // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2019. V. 95 (9). P. fiz133.
https://doi.org/doi.org/10.1093/femsec/fiz133
- Steele H.L., Streit W.R.* Metagenomics: advances in ecology and biotechnology // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 247 (2). P. 105–111.
https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.011
- Steger K., Kim A.T., Ganzert L. et al.* Floodplain soil and its bacterial composition are strongly affected by depth // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2019. V. 95 (3). P. fiz014.
https://doi.org/10.1093/femsec/fiz014
- Thomson B.C., Ostle N.J., McNamara N.P. et al.* Effects of sieving, drying and rewetting upon soil bacterial community structure and respiration rates // *J. Microbiol. Methods.* 2010. V. 83 (1). P. 69–73.
https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.021
- Wang J., Xue C., Song Y. et al.* Wheat and rice growth stages and fertilization regimes alter soil bacterial community structure, but not diversity // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1207.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01207
- Ward N.L., Challacombe J.F., Janssen P.H. et al.* Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75 (7). P. 2046–2056.
https://doi.org/10.1128/AEM.02294-08
- Wellington E.M., Berry A., Krsek M.* Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing // *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. V. 6 (3). P. 295–301.
https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00066-3
- Yergeau E., Bokhorst S., Kang S. et al.* Shifts in soil microorganisms in response to warming are consistent across a range of Antarctic environments // *ISME J.* 2012. V. 6 (3). P. 692–702.
https://doi.org/10.1038/ismej.2011.124
- Zhang L., Xu Z.* Assessing bacterial diversity in soil // *J. Soils Sedim.* 2008. V. 8 (6). P. 379–388.
https://doi.org/10.1007/s11368-008-0043-z
- Zhelezova A., Chernov T., Nikitin D. et al.* Seasonal dynamics of soil bacterial community under long-term abandoned cropland in boreal climate // *Agronomy.* 2022. V. 12 (2). P. 519.
https://doi.org/10.3390/agronomy12020519

Overview of the Main Taxonomic Groups of Microorganisms in Zonal Soils According to Metagenomic Analysis and Fluorescent *in situ* Hybridization

D. A. Yurshenas^a, * and N. N. Kashirskaya^a

^a*Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Russia*

*e-mail: dasha_ometova@mail.ru

The study of the microbial taxonomic diversity is of great theoretical importance for understanding the structure of the microbial community and the participation of microorganisms in the processes of soil formation. It is still relevant to establish the relationship of microbial diversity with soil type and landscape features. The aim of the study was to review the ecologically significant taxonomic groups of prokaryotes in the soils of the zonal series and compare the results obtained for the southern chernozem by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the literature data on the taxonomic diversity of microbial communities of chernozems. It is shown that for steppe soils, the determining group with the maximum share in the microbial community were Actinobacteria, represented mainly by oligotrophs. The soils of the forest zone were dominated by taxonomic groups responsible for the decomposition of organic matter – Acidobacteria and Proteobacteria. A negative correlation ($r = -0.77$) was found between the relative abundance of Actinobacteria and Proteobacteria in a number of zonal soils. In permafrost, forest and steppe soils, in some cases, a high relative abundance of Verrucomicrobia was noted. In desert soils, the share of this taxonomic group did not exceed 5%. In most paleosols of various ages, the proportion of Verrucomicrobia was 2–4 times less than in modern soils. The southern chernozem of the Voronezh Region studied by us was characterized by an increased proportion of Acidobacteria, a low proportion of Actinobacteria and a significant similarity in the relative abundance of Archaea, Proteobacteria and Verrucomicrobia compared with the data known for southern chernozems. The study made it possible to summarize the results obtained in recent decades on the distribution of the main taxonomic groups of prokaryotes in the soils of forest and steppe ecosystems.

Keywords: microbial communities, metagenome, taxonomic groups, Archaea, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia

УДК 579.2

О ПЕРИОДИЧЕСКИХ КОЛЕБАНИЯХ ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИРОДЕ И В ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЕ: К ТРЕТЬЕМУ ЗАКОНУ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ В МИКРОБИОЛОГИИ

© 2022 г. А. М. Семенов¹ *, А. А. Шаталов², Е. В. Семенова¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия²Groundwork BioAG, Mazor, Israel

*e-mail: amsemenov@list.ru

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 19.05.2022 г.

Принята к публикации 19.05.2022 г.

Экспериментально и теоретически обоснована объективность явления волнообразного изменения численности клеток микробных популяций и сообществ в природе или в чистой культуре микроорганизмов и значимость понимания этого феномена для экологии и биотехнологии. Обсуждена краткая история проблемы. Приведены три основных общих закона популяционной экологии. Предложена математическая модель, которая, на основании включенных в уравнения параметров, позволяет описать волнообразную динамику роста популяции чистой культуры бактерий. Эта модель является математическим выражением третьего закона популяционной экологии, отражающим динамику существования чистой культуры микроорганизмов: $dX/dt = (\mu(S) - D(S)) \times X$; $dS/dt = -X \times \mu(S)/Y + K_r \times X \times D(S)$. Предложенный экспериментальный и теоретический материал представляет интерес для микробиологов, биотехнологов – теоретиков и практиков в области культивирования микроорганизмов, а также специалистов в области популяционной экологии.

Ключевые слова: рост микроорганизмов, популяции, сообщества, волнообразная динамика, гармонический анализ, законы роста микроорганизмов

DOI: 10.31857/S0042132422060084

ВВЕДЕНИЕ

Знание основных законов популяционной экологии – неперемное условие успеха в микробной экологии и биотехнологии микроорганизмов.

Динамика роста популяций любых организмов подчиняется трем общим законам популяционной экологии: закону экспоненциального роста, закону самоограничения роста любой популяции и закону волнообразного роста в системе ресурс–потребитель (Турчин, 2002). Эти законы имеют следующие формулировки.

Закон экспоненциального роста: численность популяции растет экспоненциально, если условия для роста и размножения оптимальны, а окружающая среда по отношению к каждой особи в этой популяции остается неизменной. В отношении микроорганизмов говорят о популяции, а не о каждой особи, то есть: пока окружающая среда по отношению к этой популяции остается неизменной.

Закон самоограничения роста популяции: рост любой популяции не может продолжаться бесконечно, существует верхний предел, выше которого популяционная плотность не увеличивается. Для микроорганизмов обычно говорят о лимитировании или ингибировании роста.

Закон волнообразного роста в системе ресурс–потребитель: в системе ресурс–потребитель неизбежно возникают нестабильные колебания. Под нестабильными колебаниями подразумеваются такие колебания, которые не сводятся постепенно к точке равновесия. В системе ресурс–потребитель удельная скорость роста популяций жертвы и хищника не зависит от их собственной плотности. Классическая трактовка закона под потребителем подразумевает хищника, а под ресурсом – популяцию жертвы (Турчин, 2002). Однако в микробиологии известно, что сама популяция микроорганизмов может выступать как потребителем, так и питательным субстратом – ресурсом.

Волнообразная динамика популяции микроорганизмов наблюдается в условиях лимитиро-

ванного роста. В природных условиях, где практически постоянно имеет место недостаток субстрата, это явление особенно актуально. В эксперименте оно проявляется при длительном выращивании чистых культур. Причем, если справедливость двух первых законов для оценки поведения популяции микроорганизмов принимается безоговорочно, то третий закон многими микробиологами до сих пор не рассматривается как присущий микроорганизмам. Вместе с тем литература наполнена информацией о волнообразном развитии микробных популяций в природных условиях. Причем причины и движущие силы этого волнообразного процесса не рассматриваются или сводятся к взаимоотношению хищник—жертва. Более того, существует мнение практиков, что в условиях экспериментального или производственного выращивания чистой культуры микроорганизмов проявление третьего закона популяционной экологии не наблюдается.

Цель работы — представление и обсуждение собственных экспериментальных результатов волнообразной динамики развития *Pseudomonas fluorescens 32 gfp*, полученных при длительном лабораторном культивировании этой бактерии, данных литературы о феномене волнообразного роста популяций и сообществ микроорганизмов в природе, а также обоснование справедливости третьего закона популяционной экологии для динамики роста микробных популяций в чистой культуре.

К ИСТОРИИ НАБЛЮДЕНИЙ И ОБЪЯСНЕНИЙ ВОЛНООБРАЗНОГО РАЗВИТИЯ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Описания волнообразной динамики при ежедневном учете численности микроорганизмов в почве появились еще в 1920–30-х гг. (Cutler et al., 1922; Thornton, Taylor, 1935; Taylor, 1936). Попытка объяснить волнообразную динамику развития сообществ микроорганизмов при длительном ежедневном учете численности бактерий в виде колонии образующих единиц (КОЕ) была предпринята в 1950-е гг. Я.П. Худяковым. Он предложил гипотезу для объяснения возникновения волнообразной численности КОЕ образованием бактериями гипотетического вещества — периода, то есть саморегуляцией. Однако гипотеза не нашла экспериментального подтверждения (Худяков, 1958, 1972).

В 1970-е гг. в рамках международной биологической программы под руководством Т.В. Аристовской проведены широкие исследования численности бактерий в почве и ризосфере путем длительного ежедневного учета количества клеток под микроскопом в почвенных образцах и подсчетом в виде КОЕ. Учет был проведен в разных почвенно-климатических зонах Советского

Союза (Аристовская, 1974; Домрачева, 1974; Егорова, 1974; Евдокимова, 1974; Ефремова, 1974; Зыкина, 1974). В исследованиях показана волнообразная динамика развития бактериальных сообществ в почве. К сожалению, на момент публикации этих данных авторы не смогли применить соответствующей статистической обработки, которая уместна для анализа длинных рядов данных. В результате эта объемная и кропотливая работа не получила заслуженного внимания и оценки.

К проблеме изучения динамики численности микроорганизмов — бактерий, в частности актинобактерий и микромицетов, — путем длительного ежедневного учета клеток микроорганизмов в почве неоднократно обращались сотрудники кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ и Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (Звягинцев, 1987; Горбенко, Паников, 1989; Полянская, 1996; Ларионова и др., 2001). Этими исследованиями показана волнообразная динамика роста микробных сообществ и эмиссии CO_2 из почвы. Однако авторами не была использована соответствующая статистическая обработка длинных рядов данных, которая позволила бы продемонстрировать справедливость третьего закона популяционной экологии для микроорганизмов.

При изучении пространственной динамики численности микроорганизмов в ризосфере вдоль корня растений пшеницы обнаружена (Semenov et al., 1999; Zelenev et al., 2000) волнообразная динамика общей численности КОЕ гетеротрофных бактерий и микромицетов. Важно отметить, что волнообразная динамика численности микромицетов, учитываемых по КОЕ, наблюдалась как у интродуцированных в ризосферу растений пшеницы *Rhizoctonia solani* AG8, так и обитающих в почве диких штаммов гриба *Pythium* spp. (van Bruggen et al., 2002). Волнообразная динамика роста микроорганизмов была достоверно подтверждена не только при учете численности клеток и КОЕ микроорганизмов, но и их функциональной активности в виде эмиссии CO_2 , целлюлитической активности и азотфиксирующей активности (Лаврентьева и др., 2009; Семенов и др., 2013; Эмер и др., 2014; He et al., 2017; van Bruggen et al., 2017). Факт волнообразного развития природных микробных сообществ и популяций у исследователей не вызывал сомнения, но в интерпретации этого факта не было единодушия. Для объяснения этого факта выдвигались разные гипотезы. Наиболее распространенная гипотеза хищник—жертва не могла удовлетворительно объяснить все проявления феномена (Семенов, 2001; Zelenev et al., 2004).

Вместе с тем на осцилляцию роста популяции бактерий в лабораторных условиях при длительном периодическом режиме выращивания или не обращали внимания вообще, или объясняли ошиб-

ками измерения (Волкова и др., 2006; Herman, 2002). При длительном периодическом культивировании *Pseudomonas aeruginosa* в лаборатории на углеводородах без дополнительного внесения питательных веществ в среду, что характерно для естественных мест обитания бактерий, обнаружена (Милько, Милько, 2017) в поздней стационарной фазе волнообразная динамика роста клеток. В этих экспериментах показаны также и колебания концентрации редуцирующих сахаров в среде культивирования, полученные путем пересчета на глюкозу, что можно объяснить только лизисом части клеток. Таким образом, факты волнообразной динамики роста чистой культуры микроорганизмов при длительном периодическом культивировании некоторые экспериментаторы также отмечали, но авторы этих наблюдений (Волкова и др., 2006; Милько, Милько, 2017; Herman, 2002) не разобрались в причинах волнообразной динамики в чистой культуре, как ранее не разобрались в причинах волнообразной динамики природных микробных сообществ (Худяков, 1958; Аристовская, 1974).

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ
ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РОСТА
Pseudomonas fluorescens 32 *gfp*
В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ
ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДИЧЕСКОМ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

Авторы настоящей публикации исследовали динамику роста *Pseudomonas fluorescens* штамм 32 *gfp* в условиях длительного периодического культивирования в лаборатории с целью выявления возможных осцилляций в стационарной фазе. Использовали спонтанно устойчивый к рифампицину мутант штамма 32 *Pseudomonas fluorescens*, который был трансформирован плазмидой pVSP61TIR. Эта плазида содержала конститутивно экспрессируемый ген, ответственный за синтез зеленого флуоресцирующего белка GFP (green fluorescent protein), и ген устойчивости к канамицину (Miller, Lindow, 1997).

Культуру выращивали в жидкой и на агаризованной среде.

Состав жидкой среды для культивирования бактерий включал (г/л): протеозо-пептон – 2; K_2HPO_4 – 1.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.5; глицерин – 15 мл/л; pH среды 7.0; добавляли антибиотики канамицин и рифампицин по 50 мг/л каждого.

Для приготовления агаризованной использовали готовую для культивирования бактерий рода *Pseudomonas* среду F (Difco 0.48–17), содержащую (г/л): бакто-триптон – 10; бактопротеозо-пептон – 10; K_2HPO_4 – 1.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.5; бакто-агар – 15; pH среды 7.0; добавляли те же антибиотики.

Культивирование в жидкой среде проводили в стационарных условиях при 25°C в колбах объемом 3 л с одним литром среды в течение 60 сут.

Учет количества бактерий осуществляли прямым подсчетом клеток под люминесцентным микроскопом и по количеству колоний, выросших на агаризованной среде. Подсчитывали количество зеленых светящихся клеток в поле зрения микроскопа “Микмед-2” РПО-11 (ЛОМО, СПб, Россия) при длине возбуждающего света 450–480 нм (барьерный фильтр 520–560 нм), объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$. Для учета КОЕ в мл культуры проводили посев 100 МКл из разведений 10^{-5} и 10^{-6} на агаризованную среду в трех повторностях. Чашки Петри инкубировали при 25°C в течение 48 ч. Колонии подсчитывали при освещении синим светом (450–490 нм). Концентрацию растворенного органического вещества (РОВ) в культуральной жидкости после ее многократного разведения определяли бихроматным методом. Эксперименты повторяли дважды в разные сезоны, результаты которых обозначены как варианты (а) и (б) (рис. 1). Коэффициент корреляции между прямым учетом и учетом КОЕ составил 0.83 в варианте (а) и 0.76 – в варианте (б).

Согласно результатам наиболее чувствительного метода – микроскопического учета клеток, продолжительность экспоненциальной стадии роста *P. fluorescens* длилась до 10 сут. После экспоненты, без периода замедления роста, отсутствие которого можно объяснить особенностями использованной среды (неоднородность углеродного субстрата и др.) для выращивания бактерий, начиналась длительная стационарная фаза. Эта фаза характеризовалась резкими изменениями как динамики роста клеток, так и динамики концентрации РОВ. Сравнивая динамики численности клеток и концентрации РОВ, даже при визуальной оценке легко заметить явное несоответствие пиков на графиках во времени (рис. 1 и 2). В начале стационарной фазы численность клеток снижалась, а концентрация РОВ возрастала. Визуальный анализ стационарной фазы выявляет несколько пиков возрастания количества клеток с последующим их убыванием. Наиболее ярко выраженные пики численности на кривых роста при анализе обоих экспериментов наблюдались на 11, 28–30, 44, 53–55 сут. Анализ графиков концентрации РОВ также выявляет волнообразную динамику с пиками концентраций на 11, 21–23, 30–32, 38, 50–53, 56 сут. При этом концентрации РОВ имеют заметный тренд к снижению. Итак, с одной стороны, в динамиках роста клеток и концентрации РОВ не наблюдается четкой противофазности осцилляций, но с другой стороны, нет и совпадения пиков количества клеток и концентрации РОВ во времени. Вместе с тем, четкая волнообразная динамика численности клеток проявляется лишь только с 20-х суток, что объясняется перестройкой метаболизма культуры при ее росте в условиях глубокого лимитирования в длительном стационаре (Перт, 1978). Четкость выявляе-

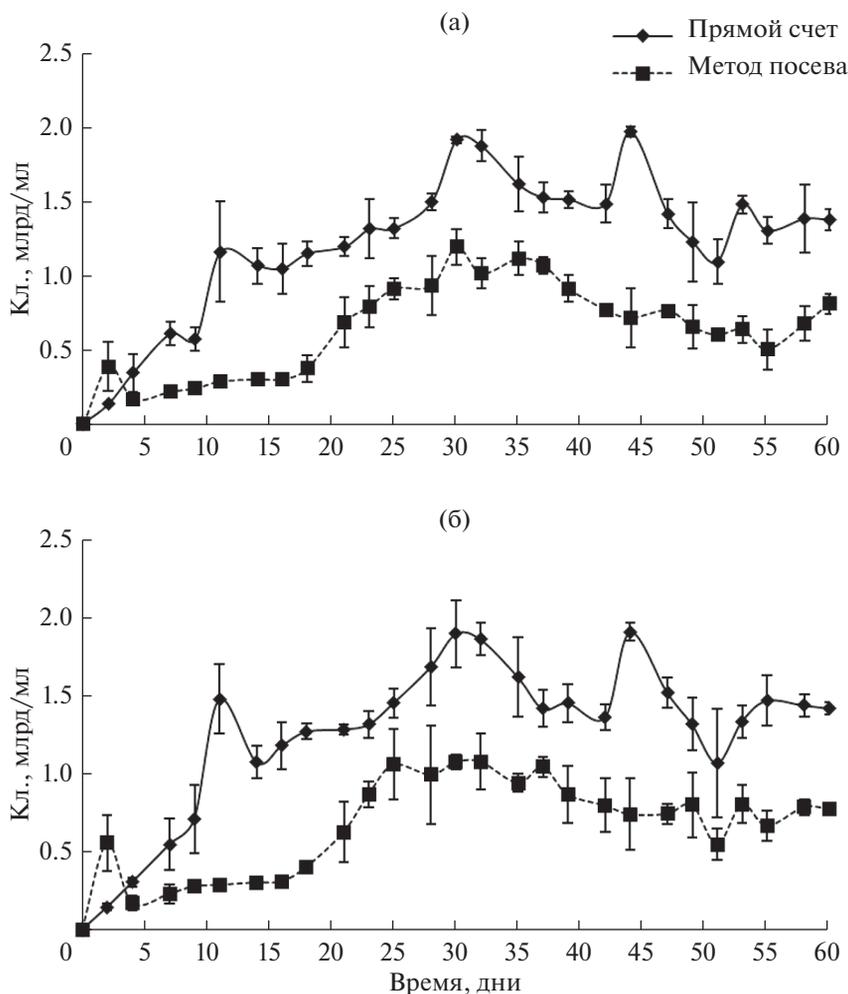


Рис. 1. Динамика роста численности бактерии *Pseudomonas fluorescens* 32 *gfp* при длительном периодическом культивировании. Количество клеток определено прямым подсчетом под микроскопом и методом посева в экспериментах (а) и (б) соответственно.

ния противофазных колебаний в динамиках количества клеток и концентрации РОВ может быть достигнута увеличением повторностей в эксперименте, частотой определения этих параметров, повышением чувствительности используемых методов определения, автоматизацией промеров и др.

На графиках восходящие стороны пиков количества клеток, как правило, более крутые, а ниспадающие – более пологие (рис. 1). Это связано с разницей в скоростях роста и отмирания бактерий. Возрастание количества клеток идет по экспоненциальному закону, а отмирание чаще всего не носит экспоненциального характера (Перт, 1978). При этом нужно учитывать явление гетерогенности популяции, которое заключается в разном физиологическом состоянии клеток, что и выражается в отличиях скоростей роста клеток. В динамике пиков РОВ, наблюдается обратное явление: снижение концентрации РОВ происходит медленнее, а накопление – быстрее (рис. 2). Это

можно объяснить тем, что процесс появления РОВ, доступных для определения, отстает во времени от процесса гибели клеток. При этом общее содержание субстрата, выраженное концентрацией РОВ, имеет тенденцию к убыванию (рис. 2).

В нашем случае отсутствие противофазных осцилляций могло быть следствием ряда причин: определение численности клеток и концентрации РОВ проводили не ежедневно, а через сутки; возможная инициация стадий подготовительного метаболизма для потребления ряда компонентов оставшегося в среде субстрата; разные скорости потребления компонентов оставшегося субстрата, возникающие в фазах роста в трофофазе и идеофазе (Madigan et al., 1997).

Тем не менее, визуальная оценка результатов показывает наличие осцилляционной динамики количества клеток и концентрации РОВ.

Для обработки экспериментальных данных был применен статистический гармонический

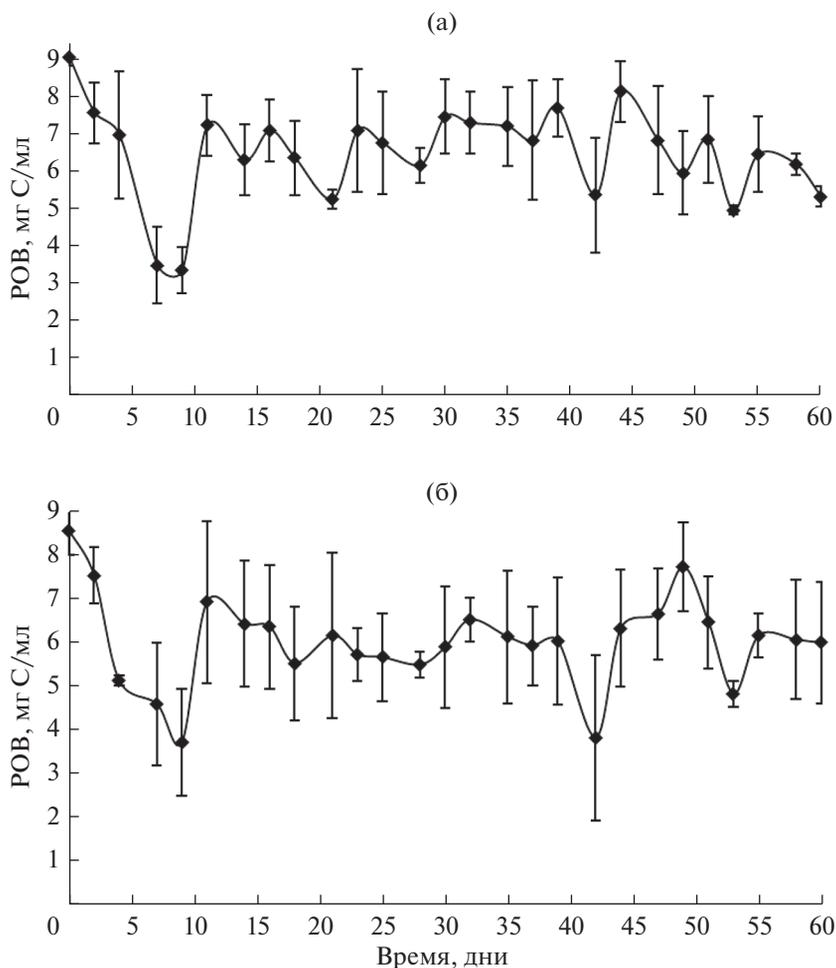


Рис. 2. Динамика количества растворенного органического вещества (POB) в периодической культуре *Pseudomonas fluorescens* 32 *gfp* в экспериментах (а) и (б) соответственно.

Фурье-анализ (Смирнов, 1974; Горбенко, Крышев, 1985). Как известно, этот анализ используют для выявления периодичности в динамических процессах, и в частности он позволяет выявить периодичность в динамике роста микробных популяций. На рис. 3 и 4 приведены результаты гармонического анализа роста культуры с 20-го по 60-й день, то есть поздней стационарной фазы, так как именно после 20-х суток роста обнаружены более четкие гармонические колебания численности клеток бактерий и органического углерода. Гармонический анализ позволяет получить следующие характеристики волнообразного роста: количество колебаний (гармоник), их амплитуды, фазы и периоды (табл. 1 и 2). Достоверность приведенных в таблице характеристик для роста численности клеток *P. fluorescens* и значений POB подтверждена расчетом F-критерия (табл. 1 и 2). Отметим, что достоверные колебания численности КОЕ были обнаружены также и при анализе результатов чашечного учета (результаты анализа не приводятся).

Таким образом, достоверные колебания численности клеток микроорганизмов имеют место в однородной популяции при отсутствии хищников. Ни хищничеством, ни традиционно понимаемым каннибализмом невозможно объяснить осцилляционную динамику популяции чистой культуры бактерий, которые являются осмотрофами и поглощают лишь растворенные вещества. Этот феномен может быть объяснен только лишь процессом отмирания части клеток популяции, автолизом этих клеток и ростом другой части популяции за счет появившегося субстрата. То есть одна и та же популяция микроорганизмов одновременно является и ресурсом, и потребителем.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ВОЛНООБРАЗНОГО РАЗВИТИЯ МИКРОБНОЙ ПОПУЛЯЦИИ В СИСТЕМЕ ПОТРЕБИТЕЛЬ–СУБСТРАТ

Ранее обнаружены (Semenov et al., 1999) достоверные колебания численности КОЕ микроорга-

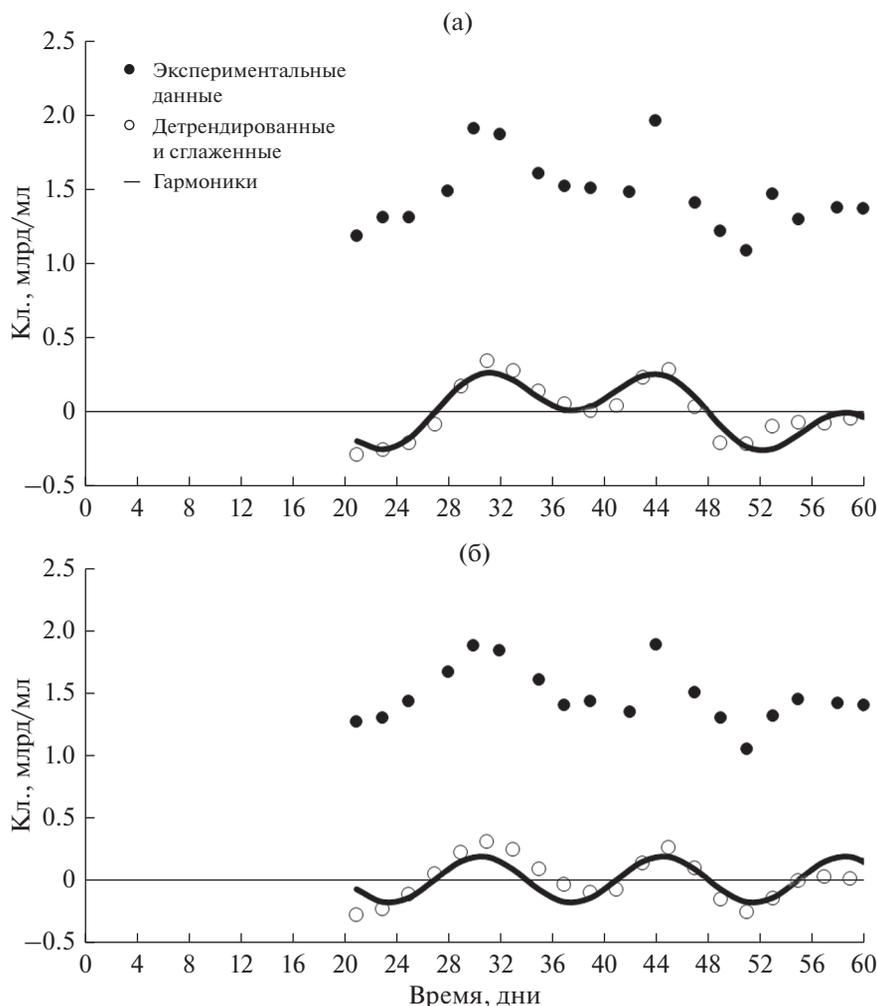


Рис. 3. Гармонический анализ результатов динамики роста *Pseudomonas fluorescens 32 gfp* в поздней стационарной фазе в экспериментах (а) и (б) соответственно.

низмов вдоль корней пшеницы в ризосферном эксперименте. Наблюдаемые волнообразные закономерности в популяциях бактерий объяснены внутренними особенностями функционирующей системы, состоящей из бактериального сообщества и его субстрата. Такая система должна включать корневую экссудацию, субстрат от переработки мертвой биомассы и субстрат от разложения органического вещества почвы с последующим потреблением всех этих веществ микроорганизмами, что обеспечивает их рост. При временном истощении субстрата часть микроорганизмов погибает (Semenov et al., 1999). На основании своих исследований авторы предложили математическую модель, адекватно описывающую волнообразное развитие микробной популяции в системе потребитель–субстрат, без включения в модель явления хищник–жертва (Zelenev et al., 2004). Модель представляет собой систему дифференциальных уравнений, описывающих динамику

роста и отмирания микроорганизмов и волнообразную динамику субстрата (Zelenev et al., 2000):

$$\begin{aligned} dX/dt &= (\mu(S) - D(S)) \times X; \\ dS/dt &= -X \times \mu(S) / Y + \\ &+ K_r \times X \times D(S) + BGF + Exu(t), \end{aligned}$$

где:

$$\begin{aligned} \mu(S) &= \mu_{\max} \times S / (K_s \times u + S); \\ D(S) &= D_{\max} \times K_d / (K_d + S/u); \\ Exu(t) &= ExuM \times \exp(-ExuT \times t); \end{aligned}$$

t – время; X – биомасса бактерий; S – содержание субстрата; $\mu(S)$ – удельная скорость роста бактерий (зависит от концентрации субстрата); μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста; K_s – субстратная константа; $D(S)$ – удельная скорость отмирания бактерий (зависит от концентрации субстрата); D_{\max} – максимальная удельная скорость отмирания бактерий; K_d – субстратная константа

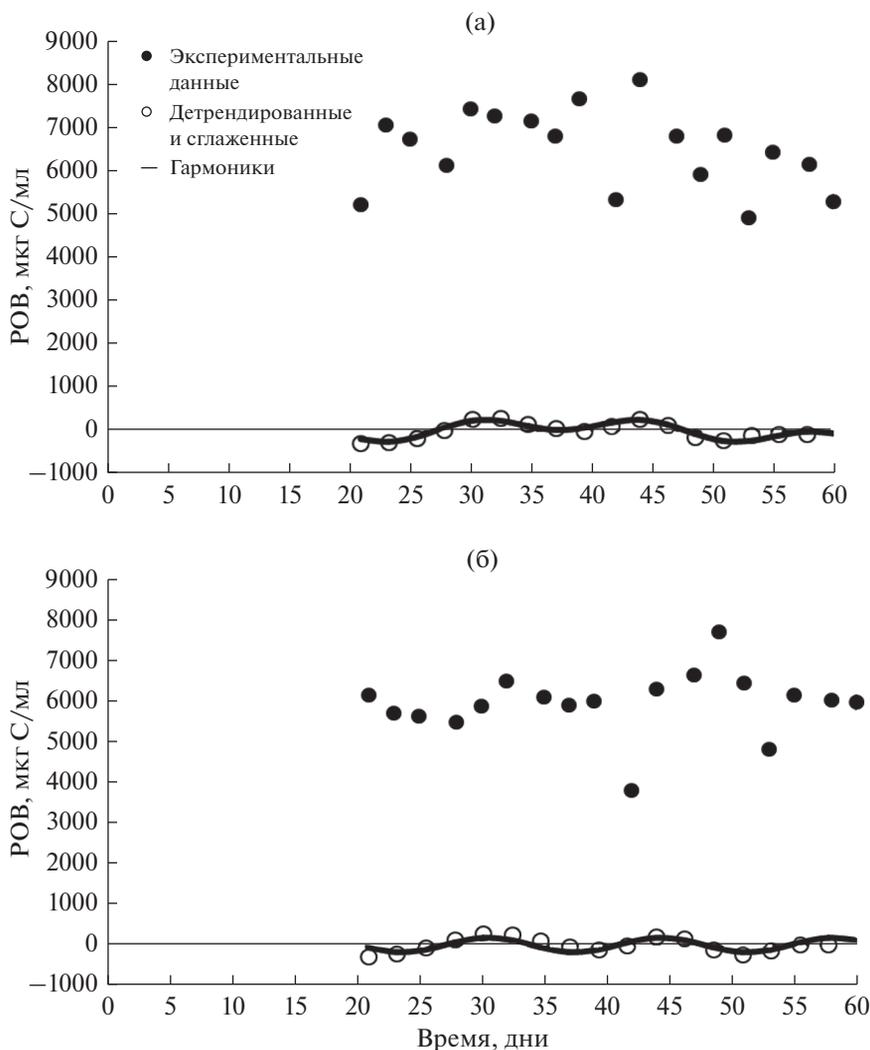


Рис. 4. Гармонический анализ результатов динамики РОВ в культуре *Pseudomonas fluorescens* 32 gfp в поздней стационарной фазе в экспериментах (а) и (б) соответственно.

отмирания бактерий; Y — экономический коэффициент для роста бактерий; K_r — доля биомассы мертвых бактерий, подвергающаяся реутилизации в виде субстрата; BGF (background flux) — константа скорости подтока субстрата из почвы при гидролизе почвенного органического вещества; u — влажность почвы; E_{xH} — максимальная скорость эксудации; E_{xT} — постоянная времени эксудации, отвечающая за продолжительность эксудации.

Авторы настоящей публикации полагают, что приведенная модель может быть адаптирована к описанию динамики роста чистой бактериальной культуры при длительном периодическом выращивании в лаборатории или на производстве. Такая адаптированная математическая модель должна объяснять возникновение осцилляций в динамике роста популяции и динамике концентрации

субстрата в стационарной фазе чистой культуры потреблением субстрата бактериями с последующим его пополнением за счет отмирания части популяции клеток, что и было продемонстрировано в представленном экспериментальном материале.

После удаления из вышеприведенной модели константы скорости подтока субстрата из почвы, параметров, учитывающих процессы эксудации, и параметра влажности почвы получены уравнения, приведенные ниже. Эти уравнения позволяют описать микробно-субстратные взаимодействия, которые приводят к волнообразной динамике популяции бактерий и субстрата в чистой культуре (рис. 3 и 4):

$$\begin{aligned} dX/dt &= (\mu(S) - D(S)) \times X; \\ dS/dt &= -X \times \mu(S) / Y + K_r \times X \times D(S), \end{aligned}$$

Таблица 1. Характеристики гармоник периодического роста культуры *Pseudomonas fluorescens* 32 *gfp* в поздней стационарной фазе, полученные с помощью гармонического Фурье-анализа при $p \leq 0.1$ и $p \leq 0.05$

№ эксперимента	1		2
Исследуемый объект	клетки		клетки
Номер гармоники	1*	3	3
Амплитуда, млрд	1.713	1.649	1.88
Фаза, дни	37.4	16.5	16.5
Период, дни	42	14	14
Частота	0.02	0.07	0.07
Коэффициент вариации, %	42.5	39.4	59.7
$F_{\text{экспер.}}$	4.25	3.94	5.97
$F_{\text{таб.}}, p = 0.1$	2.59	2.59	2.59
Количество анализируемых точек	21	21	21
$F_{\text{таб.}}, p = 0.05$	3.5	3.5	3.5

Примечание: * – на графиках приведены гармоники только высоких порядков (номеров), так как метод анализа предполагает поглощение гармониками более высоких порядков гармоник более низких порядков; $F_{\text{экспер.}}$ – коэффициент Фишера; $F_{\text{таб.}}$ – табличное значение уровня достоверности. Здесь и в табл. 2.

Таблица 2. Характеристики гармоник значения РОВ периодического роста культуры *Pseudomonas fluorescens* 32 *gfp* в поздней стационарной фазе, полученные с помощью гармонического Фурье-анализа при $p \leq 0.1$ и $p \leq 0.05$

№ эксперимента	1		2
Исследуемый объект	РОВ		РОВ
Номер гармоники	1*	3	3
Амплитуда, мкг	174.6	159.2	179.1
Фаза, дни	7.49	0.83	0.82
Период, дни	41.4	13.8	13.8
Частота	0.02	0.07	0.07
Коэффициент вариации, %	46	38.2	57.3
$F_{\text{экспер.}}$	3.91	3.25	4.87
$F_{\text{таб.}}, p = 0.1$	2.59	2.59	2.59
Количество анализируемых точек	21	21	21
$F_{\text{таб.}}, p = 0.05$	3.5	3.5	3.5

где:

$$\mu(S) = \mu_{\max} \times S / (K_s + S),$$

$$D(S) = D_{\max} \times K_d / (K_d + S),$$

t – время; X – биомасса бактерий; S – содержание субстрата; $\mu(S)$ – удельная скорость роста бактерий (зависит от концентрации субстрата); μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста; K_s – субстратная константа; $D(S)$ – удельная скорость отмирания бактерий (зависит от концентрации субстрата); D_{\max} – максимальная удельная скорость отмирания бактерий; K_d – субстратная константа отмирания бактерий; Y – экономический коэффициент для роста бактерий; K_r – доля биомассы мертвых бактерий, подвергнутая реутилизации в виде субстрата.

В модифицированной математической модели возникновение осцилляций в динамике численности клеток и концентрации субстрата в стационарной фазе чистой культуры объясняется потреблением субстрата бактериями с последующим его пополнением за счет отмершей части популяции клеток, что наблюдается в представленном экспериментальном материале.

ОБСУЖДЕНИЕ

Феномен волнообразной динамики развития сообществ и популяций микроорганизмов в естественных условиях отмечен многими исследователями. Для объяснения этого феномена в литературе можно найти более полудюжины гипотез, большинство из которых и фантастичны, и не до-

казуемы (Звягинцев, 1987; Горбенко, Паников, 1989). Таким образом, отмечаем объективный и важный факт существования волнообразной динамики роста чистой культуры микроорганизмов при длительном периодическом культивировании. Еще раз подчеркнем, что экспериментаторы наблюдали такую динамику (Волкова и др., 2006; Милько, Милько, 2017; Herman, 2002), но по каким-то причинам не разобрались в сути этого явления, как ранее не разобрались в причинах волнообразной динамики природных микробных сообществ и другие ученые (Худяков, 1958; Аристовская, 1974).

Недавние исследования позволяют выдвинуть еще одну гипотезу, которая тоже может объяснять осцилляции роста популяции микроорганизмов и даже микробных сообществ. Это переход части популяции из активного состояния в состояние “переживания”, когда клетки остаются живыми, но не проявляют физиологической активности, которую можно обнаружить известными методами. Такие клетки являются живыми, но не культивируемыми – VBNC (viable but nonculturable) (Kapreylants, Kell, 1993; Haldeman et al., 1995). Однако такое состояние клеток можно выявить только одновременным применением сразу двух методов: высевом на твердые среды для учета КОЕ и общим учетом клеток, помеченных красителем и выявленных под микроскопом.

Для обозначения периодических или аperiodических колебаний численности организмов в природных популяциях используется понятие популяционных волн (Четвериков, 1926). Такие колебания объясняются отношением хищник–жертва. Явление хищник–жертва среди высших животных можно выявить только многолетними наблюдениями, что делает их более трудными, но и более убедительными. В первой половине XX в. предложена (Lotka, 1925; Volterra, 1926) математическая модель взаимодействия популяций двух разных видов хищник–жертва. Модель Лотки–Вольтерры позволяет показать основную тенденцию в отношениях хищник–жертва, которая выражается возникновением колебаний в численностях популяций. Эта модель положила начало описанию взаимодействия живых существ математическими уравнениями, что позже привело к использованию математических моделей для выражения законов популяционной экологии.

В микробиологии математическое моделирование получило активное развитие с 1950-х гг. Динамика роста чистой культуры микроорганизмов в периодическом режиме хорошо изучена экспериментально, разделена на фазы и описана математически. В первую очередь это касается экспоненциальной фазы роста популяции, которая описана уравнением: $x = x_0 \times e^{kt}$. Приведенное уравнение является математическим выражением

первого закона популяционной экологии, который справедлив и для популяции микроорганизмов в том числе.

Второй общий закон популяционной экологии – закон ограничения роста популяций – тоже первоначально был обнаружен и описан специалистами в области общей экологии (Турчин, 2002). Для микроорганизмов он проявляется через лимитирование или ингибирование роста. Математически этот закон выражается уравнениями:

лимитирования роста субстратом (уравнение Моно):

$$\mu = \mu_{\max} \times S / (K_s + S),$$

где S – концентрация субстрата, K_s – константа насыщения, или субстратная константа, численно равная концентрации субстрата, при которой удельная скорость роста достигает половины от максимальной;

ингибирования роста продуктами метаболизма (уравнение Иерусалимского):

$$\mu = \mu_{\max} \times K_p / (K_p + P),$$

где P – концентрация продуктов метаболизма, K_p – константа ингибирования, численно равная концентрации продукта, при которой максимальная скорость роста культуры замедляется вдвое.

Как отмечено выше, длительные колебания численности популяций – популяционные волны в общей экологии пытались математически выразить Лотка и Вольтерра (Lotka, 1925; Volterra, 1926). Предложенная ими математическая модель выглядит следующим образом:

$$dN/dt = r \times N - a \times N \times P,$$

$$dP/dt = -d \times P + c \times a \times N \times P,$$

где N и P – плотности популяций ресурса (жертвы) и потребителя (хищника) соответственно; r – удельная скорость роста популяции жертвы в отсутствие хищников; d – удельная скорость снижения численности популяции хищников в отсутствие жертв; a – скорость поиска жертв хищниками; c – коэффициент пропорциональности, связывающий количество потребленных жертв с количеством рождающихся в единицу времени хищников.

Данная модель нашла широкое распространение и признание, но подверглась критике с точки зрения современной популяционной экологии (Турчин, 2002).

Применение в наших исследованиях гармонического анализа для обработки данных ежедневного учета микроорганизмов и количества субстрата доказало наличие закономерных и статистически достоверных колебаний количества клеток и концентрации субстрата в стационарной фазе роста чистой культуры. Рассчитанные параметры гармоник подтвердили соответствие волнообразного роста гармоническому закону, где причины

волнообразных колебаний количества клеток в популяциях микроорганизмов – рост и отмирание, а механизмы – это потребление субстрата клетками и восполнение субстрата за счет лизиса отмершей части популяции. Предложенная в данной публикации модель для описания динамики численности монокультуры микроорганизмов в длительной стационарной фазе роста представлена двумя уравнениями:

$$\begin{aligned} dX/dt &= (\mu(S) - D(S)) \times X; \\ dS/dt &= -X \times \mu(S)/Y + K_r \times X \times D(S). \end{aligned}$$

Предлагаемая модель, в отличие от модели Лотки–Вольтерры, не предусматривает хищника, а причиной колебаний является периодичность процессов роста и отмирания клеток популяции как следствие взаимодействий ресурс–потребитель, где микроорганизмы попеременно играют роль и потребителя, и ресурса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первый общий закон популяционной экологии – закон экспоненциального роста любых организмов – описан наиболее простым уравнением, тем самым подчеркивается отсутствие всяких ограничений для роста. Имеется не ограниченный субстрат, поступающий из вне, не производящийся самим организмом или популяцией организмов, а любые другие ограничения отсутствуют. Такие условия возникают в природе кратковременно, но постоянно. Живая система всегда развивается, а если нет ограничений, развивается не ограниченно. П.В. Турчин совершенно правомерно сравнил этот закон роста с первым законом Ньютона, в котором постулируются отсутствие ограничивающих влияний на процесс.

Второй закон представлен уже более сложным уравнением, так как в нем учтены возникшие условия, ограничивающие безудержный рост популяций, это, в первую очередь, субстрат или какие-то другие ключевые для роста ограничения. Для микроорганизмов такие ограничения идентифицируются несравненно легче и понятней. Введение в уравнение параметров, обозначающих возникающие ограничения в виде или дефицита субстрата (Monod, 1949), или накопления токсичного продукта (Иерусалимский, 1963), образуемого самим экспоненциально растущим организмом, хорошо соответствует экспериментальным данным.

Третий закон наиболее сложный. В этом законе разрешаются противоречия между первым и вторым законами – стремление к неограниченному росту и наличие ограниченного количества субстрата или других ключевых ограничений, относящихся к категории узких мест, по Либиху. Для его соответствия экспериментальным ре-

зультатам, наблюдаемым в микробиологии при культивировании одновидовой популяции в полужакрытой системе, и для выполнения необходимых условий уже требуются параметры двух уравнений.

По существу, противоречия разрешаются образованием замкнутой системы, популяция замыкается сама на себя, временно образуя замкнутый пищевой цикл. Интересно предположить, как долго могла бы так существовать биосистема из экстремально анаэробных бактерий.

Предложенные объяснения и их выражение в параметрах уравнений не противоречат экспериментальным результатам. Тем самым проинтерпретировано одно из объективно существовавших, но долгое время непонятных явлений – волнообразное колебание численности организмов или их метаболитов в чистых культурах. При этом проявления жизни и закон сохранения вещества и энергии выполняются.

Прикладное, технологическое значение этого открытия и понимания явления волнообразного развития микробных популяций и сообществ уже нашло свое применение – был разработан способ определения параметров здоровья почвенной экосистемы (Семенов и др., 2011; Семенов, Семенова, 2018).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят к. б. н. В.В. Зеленева (Россия) и профессора А.Н.С. van Bruggen (Nederlands) за сотрудничество, доктора Ronald Sayler, Univ. of Arkansas (USA) за любезно предоставленный штамм *Pseudomonas fluorescens* 32 *gfp*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках Научного проекта Государственного заказа Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету им. М.В. Ломоносова № 121032300094-7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аристовская Т.В. О некоторых итогах работ по международной биологической программе в области почвенной микробиологии // Закономерности развития почвенных микроорганизмов / Ред. Т.В. Аристов-

- ская. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, Центр. музей почвоведения, 1974. С. 5–14.
- Волкова М.А., Кононова Л.И., Филатова Л.Б. Изучение роста *Rhodococcus ruber* на гидрофобном субстрате // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии / Мат. междунар. конф. (26–28 мая 2004, Минск). Минск: НАН РБ, 2006. С. 120–124.
- Горбенко Ю.А., Крышев И.И. Статистический анализ динамики морской экосистемы микроорганизмов. Киев: Наукова думка, 1985. 144 с.
- Горбенко А.Ю., Паников Н.С. Количественное описание динамики роста гетеротрофных микроорганизмов в почве в связи с первичным продукционным процессом в биогеоценозе // Журн. общ. биол. 1989. Т. 50. № 1. С. 38–59.
- Домрачева Л.И. Динамика развития водорослей в дерново-подзолистой почве при ежесуточном определении // Закономерности развития почвенных микроорганизмов / Ред. Т.В. Аристовская. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, Центр. музей почвоведения, 1974. С. 38–51.
- Евдокимова Г.А. Продуктивность микроорганизмов в ризосфере многолетних злаков в заполярье // Закономерности развития почвенных микроорганизмов / Ред. Т.В. Аристовская. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, Центр. музей почвоведения, 1974. С. 87–104.
- Егорова С.В. Изучение размеров биомассы бактерий в почвах лесов // Закономерности развития почвенных микроорганизмов / Ред. Т.В. Аристовская. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, Центр. музей почвоведения, 1974. С. 70–76.
- Ефремова Т.Н. Динамика кратковременных колебаний численности бактерий в некоторых почвах полупустыни // Закономерности развития почвенных микроорганизмов / Ред. Т.В. Аристовская. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, Центр. музей почвоведения, 1974. С. 77–86.
- Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: МГУ, 1987. 256 с.
- Зыкина Л.В. Ежедневная динамика численности бактерий в дерново-подзолистых почвах под луговыми угодьями // Закономерности развития почвенных микроорганизмов / Ред. Т.В. Аристовская. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, Центр. музей почвоведения, 1974. С. 168–177.
- Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов. М.: АН СССР, 1963. 244 с.
- Лаврентьева Е.В., Семенов А.М., Зеленеv В.В. и др. Ежедневная динамика целлюлазной активности в пахотной почве в зависимости от обработки // Почвоведение. 2009. № 8. С. 952–961.
- Ларионова А.А., Розанова Л.Н., Демкина Т.С. и др. Годовая эмиссия CO₂ из серых почв южного Подмосковья // Почвоведение. 2001. № 1. С. 72–80.
- Милько Е.С., Милько Д.М. Значение гетерогенности популяции бактерий при решении биотехнологических задач на примере r-, s- и m-вариантов (диссоциантов) *Pseudomonas aeruginosa* // Экол. промышл. России. 2017. Т. 21. № 9. С. 53–57.
- Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
- Полянская Л.М. Сукцессия микробов в почве: Автореф. дис... докт. биол. наук. М.: МГУ, 1996. 96 с.
- Семенов А.М. Осцилляции микробных сообществ в почве // Перспективы развития почвенной биологии / Тр. Всерос. конф. (22 февраля 2001, Москва). М.: МАКС Пресс, 2001. С. 57–72.
- Семенов А.М., Семенова Е.В. Почва как биологическая система и ее новая категория — здоровье // Успехи соврем. биол. 2018. Т. 138. № 2. С. 115–125.
- Семенов А.М., Бубнов И.А., Семенов В.М. и др. Ежедневная динамика численности бактерий и эмиссии CO₂ почвы и связь их волнообразных колебаний с сукцессией микробного сообщества // Почвоведение. 2013. № 8. С. 963–979.
- Семенов А.М., ван Бругген А.Х.К., Бубнов И.А., Семенова Е.В. Способ определения параметра здоровья у образцов почвы, компостов и других твердых субстратов. Пат. № 2 408 885. Госреестр изобр. РФ 10.01.2011.
- Смирнов В.И. Курс высшей математики. Т. 2. М.: Наука, 1974. 655 с.
- Турчин П.В. Есть ли общие законы в популяционной экологии? // Журн. общ. биол. 2002. Т. 63. № 1. С. 3–14.
- Худяков Я.П. Периодичность микробиологических процессов в почве // Журн. общ. биол. 1958. Т. 40. № 3. С. 448.
- Худяков Я.П. Периодичность микробиологических процессов в почве и ее причины // Вопросы численности, биомассы и продуктивности почвенных микроорганизмов / Ред. Т.В. Аристовская. Л.: Наука, 1972. С. 20–37.
- Четвериков С.С. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики // Журн. exper. биол. Сер. А. 1926. Т. 2. № 1. С. 3–54.
- Эмер Н.Р., Семенов А.М., Зеленеv В.В. и др. Ежесуточная динамика численности и активности азотфиксирующих бактерий на участках залежной и интенсивно возделываемой почвы // Почвоведение. 2014. № 8. С. 963–970.
- Cutler D.W., Crump L.M., Sandon H.A. Quantitative investigation of the Bacterial and Protozoan population of the soil with an account of the Protozoan fauna // Philos. Trans. Roy. Soc. Ser. B. 1922. V. 211. P. 317.
- Haldeman D.L., Amy P.S., Ringelberg D. et al. Microbial growth and resuscitation after community structure after perturbation // FEMS Microbiol. Ecol. 1995. V. 17. P. 27–38.
- He M., Ma W., Zelenev V.V. et al. Short-term dynamics of greenhouse gas emissions and cultivable bacterial populations in response to induced and natural disturbances in organically and conventionally managed soils // Appl. Soil Ecol. 2017. V. 119. P. 294–306.
- Herman P.K. Stationary phase in yeast // Curr. Opin. Microbiol. 2002. V. 5. P. 602–607.
- Kapreylants A.S., Kell D.B. Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 3187–3196.
- Lotka A. Elements of physical biology. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1925. 460 p.

- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J.* Brock biology of microorganisms. 8th edition. US: Pearson Education, 1997. 986 p.
- Miller W.G., Lindow S.E.* An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions // *Gene*. 1997. V. 191. P. 149–152.
- Monod J.* The grows of bacterial cultures // *Ann. Rev. Microbiol.* 1949. V. 3. P. 371–394.
- Semenov A.M., van Bruggen A.H.C., Zelenev V.V.* Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat // *Microb. Ecol.* 1999. V. 37. P. 116–128.
- Taylor C.B.* Short-period fluctuations in the numbers of bacterial cells in soil // *Proc. Roy. Soc. B.* 1936. V. 119. P. 269–295.
- Thornton H.G., Taylor C.B.* Short-period fluctuations in bacterial numbers in soil // *Trans. Third Int. Congr. of Soil Sci.* 1935. V. 1. P. 175–179.
- van Bruggen A.H.C., Semenov A.M., Zelenev V.V.* Wavelike distributions of infections by an introduced and naturally occurring root pathogen along wheat roots // *Microb. Ecol.* 2002. V. 44. P. 30–38.
- van Bruggen A.H.C., He M., Zelenev V.V. et al.* Relationships between greenhouse gas emissions and cultivable bacterial populations in conventional, organic and long-term grass plots as affected by environmental variables and disturbances // *Soil Biol. Biochem.* 2017. V. 114. P. 145–159.
- Volterra V.* Fluctuations in the abundance of a species considered mathematically // *Nature*. 1926. V. 118. Iss. 2972. P. 558–560.
- Zelenev V.V., van Bruggen A.H.C., Semenov A.M.* “BAC-WAVE”, a spatial-temporal model for traveling waves of bacterial populations in response to a moving carbon source in soil // *Microb. Ecol.* 2000. V. 40. P. 260–272.
- Zelenev V.V., Berkelmans R., van Bruggen A.H.C. et al.* Daily changes in bacterial-feeding nematode populations oscillate with similar periods as bacterial populations after a nutrient impulse in soil // *Appl. Soil Ecol.* 2004. V. 26. P. 93–106.

About Periodic Fluctuations in the Number of Microorganisms Cells in Nature and in Pure Culture: To the Third Law of Population Ecology in Microbiology

A. M. Semenov^{a, *}, A. A. Shatalov^b, and E. V. Semenova^a

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov State University, Moscow, Russia

^bGroundwork BioAG, Mazor, Israel

*e-mail: amsemenov@list.ru

Experimentally and theoretically substantiated the objectivity of the phenomenon of wave-like changes in the number of cells of microbial populations and communities in nature or in a pure culture of microorganisms, and the significance of understanding this phenomenon for ecology and biotechnology. A brief history of the problem is discussed. Three basic general laws of population ecology are given. A mathematical model is proposed, which, based on the parameters included in the equations, makes it possible to describe the wave-like dynamics of the growth of a population of a pure bacterial culture. This model is a mathematical expression of the third law of population ecology, reflecting the dynamics of the existence of a pure culture of microorganisms: $dX/dt = (\mu(S) - D(S)) \times X$; $dS/dt = -X \times \mu(S)/Y + K_r \times X \times D(S)$. The experimental and theoretical material presented in the work will be of interest to microbiologists, biotechnologists – theorists and practitioners in the field of cultivation of microorganisms, as well as specialists in the field of population ecology.

Keywords: growth of microorganisms, populations, communities, wave-like dynamics, harmonic analysis, laws of growth of microorganisms

УДК 631.48:930.26

СЛЕДЫ ДРЕВНЕЙ АНТРОПОГЕННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В ПОЧВАХ (НА ПРИМЕРЕ ПОСЕЛЕНИЯ ЭПОХИ БРОНЗЫ АРБАКОЛ-1 В КИСЛОВОДСКОЙ КОТЛОВИНЕ)

© 2022 г. А. А. Петросян¹, *, Т. Э. Хомутова¹, Н. Н. Каширская¹, Д. С. Коробов², А. В. Борисов¹¹Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Московская обл., Россия²Институт археологии РАН, Москва, Россия

*e-mail: Alisa_mayakovskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 01.04.2022 г.

Принята к публикации 04.04.2022 г.

Выявление следов древнего антропогенного преобразования почв и ландшафтов проводится путем оценки химических свойств и биологической активности почв в пределах потенциальной экономической зоны поселения. Объектом исследования явилось поселение эпохи поздней бронзы Арбакол-1 (кобанская культура, IX–VI вв. до н.э.) в окрестностях г. Кисловодск. Изучались почвы на территории поселения и почвы прилегающей к поселению хозяйственной зоны. Разрезы почвы заложены в катенарном сопряжении на верхней, средней и нижней частях склона. Проведено определение магнитной восприимчивости, содержания органического углерода, органических и минеральных форм фосфора, субстрат-индуцированного дыхания, микробной биомассы по присутствию фосфолипидов. Особый акцент сделан на изучении микробиологических свидетельств древней хозяйственной деятельности, которые могут накапливаться и храниться в микробной и ферментативной памяти почв. Показано, что микробиологические свойства почв сельскохозяйственных угодий вблизи древних поселений служат надежными индикаторами сельскохозяйственного освоения территории. Максимальные величины всех индикаторов древней антропогенной деятельности наблюдались на территории поселения. На участках потенциальной экономической зоны в средней и нижней частях склона в древних пахотных горизонтах, содержащих керамику, выявлено увеличение показателей биологической активности и магнитной восприимчивости, а также повышенные значения содержания фосфатов. Показана перспективность использования микробиологических методов в исследовании археологических памятников и реконструкции антропогенного преобразования почв в древности и средневековье.

Ключевые слова: почвы, антропогенное воздействие, микробная биомасса, ферментативная активность

DOI: 10.31857/S0042132422040081

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы устойчивого функционирования почв в горной зоне в условиях повсеместного распространения склонов неизменно привлекают внимание исследователей (Аличаев, Казиев, 2016; Абдусаламова, Баламирзоева, 2020; Татаринцев и др., 2020; Воскова и др., 2021; Zuazo et al., 2006). В первую очередь это связано с опасностью эрозионных процессов в условиях антропогенной нагрузки (Караваев и др., 2020; Mohammed et al., 2020).

Следует отметить, что многие экологические проблемы имеют унаследованный характер и ведут начало с первых этапов освоения горных регионов (Фетисов, 2014). Изменения в почве в большей степени связаны с поселениями, когда прилегающая территория вовлекается в сельско-

хозяйственный оборот. Этой тематике посвящены многие работы, в их числе (Лисецкий, 2008; Sandor, Eash, 1995; Wilson et al., 2005). Однако особенности агрогенной трансформации почв в условиях горной зоны остаются недостаточно исследованными.

Современные методы позволяют оценить масштабы нарушений почвенного покрова на протяжении прошлых эпох (Heckmann, 2011). С древности человек использовал эффективные способы освоения горных территорий – террасирование склонов и сохранение естественного растительного покрова между террасами, что позволяло успешно бороться с почвенной эрозией (Аличаев, Казиев, 2016). Чем более благоприятными для земледельческого освоения были исходные почвы, тем бо-

лее длительному и сильному антропогенному преобразованию они подвергались (Коробов, Борисов, 2020; Борисов и др., 2021б). При этом запустение освоенных территорий также могло приводить к усилению эрозионных процессов, особенно в первые годы, что влекло за собой значительные потери почвы (Cerdà et al., 2018). Накопление отложений на нижележащих участках в некоторой степени компенсировало потери плодородия на склонах (van Loo et al., 2017).

Известно, что территория, расположенная в радиусе 500–1000 м вокруг поселений, потенциально может входить в экономическую зону памятника, что нашло отражение в известной off-site-концепции (Bintliff, 2000). Маркером древнего земледельческого освоения территории служит керамика, которая попадала на поля при внесении удобрений (Wilkinson, 1982). Границы потенциальных экономических зон древних поселений можно установить путем сопоставления наличия керамики в почвах (Wilkinson, 1982), следов межевания (Lisetskii et al., 2013), урезной активности (УА) (Chernysheva et al., 2015) и содержания фосфатов (Борисов, Коробов, 2013). Так, в частности, в окрестностях средневекового поселения Подкумское-3 в Кисловодской котловине было показано увеличение содержания подвижных фосфатов, общего фосфора, органического углерода и существенное увеличение микробной биомассы (Chernysheva et al., 2018).

В горной зоне признаками земледельческого освоения территории могут служить террасы, однако почвы пологих склонов вблизи поселений, то есть в пределах потенциальных экономических зон, могут обрабатываться без террасирования, либо следы террас не сохраняются (Борисов, Коробов, 2013). Здесь свидетельства древнего земледелия определяются, прежде всего, по наличию керамики, которая попадала в почву вместе с удобрениями. При этом почвы эпохи бронзы, как правило, не сохраняют следов распашки и оборота пласта в профиле, и информацию о древнем земледелии можно получить благодаря присутствию керамики, обугленных микроостатков культурных злаков и другим морфологическим и химическим признакам (Borisov et al., 2020).

Для выявления особенностей антропогенного освоения ландшафтов в древности используется широкий ряд методов почвоведения и смежных дисциплин (Каширская и др., 2021), а в последние годы – и методы почвенной микробиологии (Борисов и др., 2021б; Каширская и др., 2021; Ivanova, Marfenina, 2015; Margesin et al., 2017). Многочисленные исследования показали, что практически все характеристики микробного сообщества демонстрируют существенные различия между почвами поселений и фоновыми почвами, не подвергавшимися антропогенному воздействию

(Чернышева и др., 2016). В культурных слоях увеличивается содержание органического углерода и фосфатов, доля активно метаболизирующих клеток, биомасса грибного мицелия и количество ксерофильных грибов на фоне стабильного уровня суммарной микробной биомассы (Peters et al., 2014). При этом микробиологический анализ существенным образом расширяет информационный потенциал геофизических методов изучения археологических памятников (Peters et al., 2014; Smekalova et al., 2020; Zhurbin, Borisov, 2020). Так, информативным показателем антропогенного преобразования почв является магнитная восприимчивость. Повышение ее уровня может указывать на пирогенное воздействие на почву (Fassbinder, Stanjek, 1993) либо на оптимизацию условий для функционирования почвенных бактерий – железоредукторов (Алексеев и др., 2020).

Обогащение почв органическим веществом антропогенного происхождения приводит к росту численности биомассы микробных сообществ. В качестве надежных биомаркеров древнего антропогенного влияния используются фосфолипиды жирных кислот в культурных слоях (Zhang et al., 2020), которые дают информацию о живом сообществе почвенных микроорганизмов. Принадлежность этих соединений только живым микробным клеткам обусловлена их высокой скоростью разложения в почве (Zhang et al., 2019). Предполагается, что большая часть интактных полярных липидов в органическом веществе почвы (45–80%) принадлежит бактериальному сообществу (Ding et al., 2020). Показано, что величины содержания органического углерода и валового фосфора, а также УА в культурном слое внутренней части поселения существенно выше, чем в культурном слое внешней части поселения (Kashirskaia et al., 2021).

Информация об антропогенной деятельности в прошлом может накапливаться и храниться в микробной и ферментной памяти почв и культурных слоев. Микробная память – это способность почвенного микробного сообщества изменять структуру, функциональное разнообразие и биологическую активность в результате воздействия антропогенных факторов и сохранять эти изменения в течение веков и тысячелетий (Борисов и др., 2021а). Возрастание численности почвенных микроорганизмов в результате поступления органических веществ с бытовым мусором на территории поселения или с удобрениями на территории сельскохозяйственной зоны поселения приводит к увеличению ферментативной активности. Способность ферментов накапливаться и сохраняться в почве на протяжении длительного времени понимается как ферментная память почв (Борисов и др., 2021б). Ферменты выделяются в почву в процессе разложения органических остатков микроорганизмами. Сохранение ферментов без потери их активности возможно в почвах на протя-

жении длительных периодов времени (Хомутова и др., 2012; Skujins, 1976; Nannipieri et al., 2002; Chernysheva et al., 2017).

Увеличение биомассы микроорганизмов приводит к росту ферментативной активности в почвах и культурных слоях поселений. Рост фосфатазной активности (ФА) связан с поступлением в почвы соединений фосфора вместе с органическими отходами, а также может свидетельствовать о внесении удобрений в почвы пахотной зоны, что согласуется с присутствием керамики в окрестностях археологических памятников (Каширская и др., 2021; Holliday, Gartner, 2007). Присутствие навоза в качестве удобрения выявляется по увеличению активности различных ферментов, участвующих в его разложении (Chernysheva et al., 2021). Высокая УА и обилие термофильных микроорганизмов в почвах сельскохозяйственных угодий вблизи археологических памятников служат надежными показателями сельскохозяйственного освоения территории (Каширская и др., 2021).

Показано, что в почве древней земледельческой террасы (около 1500 л. н.) сохранялся высокий уровень ФА, превышающий ферментативную активность современных целинных и пахотных почв (Dick et al., 1995). Увеличение уровня ФА наблюдалось в почвах на территории поселений возрастом более 4000 лет – в культурных слоях, формирование которых было связано с антропогенной деятельностью в различные периоды функционирования поселений (Каширская и др., 2020; Потапова и др., 2020).

Показана возможность длительного сохранения УА в почвах, подвергшихся антропогенному воздействию более 3000 лет назад. Значительное увеличение активности ферментов выявлено в почвах потенциальной экономической зоны средневекового поселения (Чернышева и др., 2014; Chernysheva et al., 2015).

Цель данной работы – выявление следов антропогенной деятельности в древности путем оценки биологической активности почв катенарного сопряжения на пологом склоне, не подвергавшемся террасированию в потенциальной экономической зоне поселения эпохи бронзы Арбакол-1 в окрестностях г. Кисловодск.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Палеопочвенные исследования проводились на территории Кисловодской котловины. Объекты исследования – поселение Арбакол-1 кобанской культуры (IX–VI вв. до н.э.) и потенциальная экономическая зона вокруг поселения, которое располагается на склоне юго-восточной экспозиции на левом берегу р. Аликоновка (Малокарачаевский р-н Карачаево-Черкесской Республики). Кисловодская котловина по высотным отметкам явля-

ется горной зоной, по климатическим характеристикам относится к предгорной макроне. Климат региона умеренно-континентальный. Осадки за год составляют примерно 600 мм. Среднегодовая температура +8°C (Русеева, 1971; Шеуджен и др., 2001). В целом для территории Кисловодской котловины характерно несколько этапов хозяйственного освоения в прошлом. Наиболее интенсивная распашка территории имела место во время существования кобанской культуры (IX–VI вв. до н.э.). Второй этап земледельческого освоения связан с аланской культурой раннего Средневековья (V–VIII вв. н.э.). После этого на территории Кисловодской котловины не было распашки, что обеспечило уникальные условия для сохранности археологических объектов.

Поселение Арбакол-1 – типичный объект для данного региона, где хорошо доказано наличие высокоразвитого сельскохозяйственного освоения этой территории в кобанское время. Ранее показано, что территории вокруг поселения распахивались в этот период, и следы распашки частично сохранились до наших дней на крутых склонах. На пологих склонах террасы заплыли и не выделяются в рельефе. В почвах обнаружено значительное возрастание встречаемости керамики, в сравнении с фоновыми показателями, что доказывает факт внесения органических удобрений в культивируемые почвы поселения (Коробов, 2017; Коробов, Борисов, 2020).

Поселение Арбакол-1 кобанской культуры располагалось на скальном мысу в нижней части склона, а его потенциальная экономическая зона располагалась на склоне, примыкающем к поселению с севера, и ограничивалась с двух сторон балками (рис. 1). Оставшийся участок около поселения предположительно предназначался для земледельческого освоения. Полевые разведки, проведенные в районе исследования, и анализ подъемного археологического материала, а также анализ керамики из почвенных разрезов позволяют утверждать, что основные антропогенные преобразования почв на данной территории связаны с ее сельскохозяйственным освоением в эпоху позднего бронзового века во время существования кобанской культуры. Материалов других эпох не обнаружено.

Для поиска следов древнего освоения территории исследованы три почвенных разреза по катенарному сопряжению на склоне крутизной 10°–12°. Разрезы заложены: в верхней части склона в эрозионной зоне (разрез 1), в средней части склона в области тылового шва (разрез 2) и в нижней части склона (разрез 3). Также изучался археологический шурф на территории поселения Арбакол-1 (Коробов, 2017), которое располагалось на пологом мысу у подножья склона. Современный почвенный покров представлен темногумусовы-

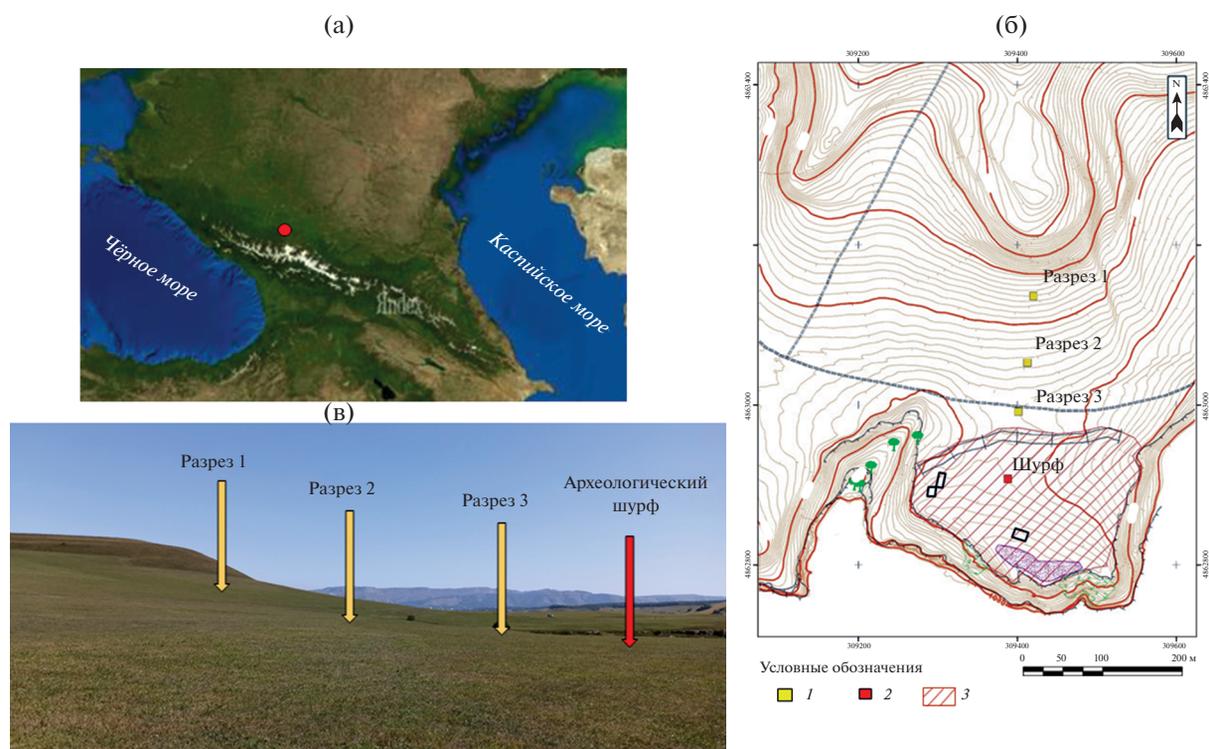


Рис. 1. Регион исследования (а), вид на потенциальную экономическую зону поселения Арбакол-1 (б), расположение почвенных разрезов и археологического шурфа (в). 1 – почвенные разрезы, 2 – археологический шурф, 3 – границы поселения.

ми почвами (UM) на элюво-делювии глин и песчаников нижнего мела.

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ПОЧВЕННОГО ПРОФИЛЯ

Разрез 1

Заложен в верхней части склона в зоне преимущественной эрозии. В профиле выделяются горизонты:

AU 0–20 см. Темно-серый – до черного во влажном состоянии. Легкий суглинок комковато-зернистой структуры. Свежий. Плотный. На поверхности дернина 2–3 см. Присутствуют корни и норы почвенной мезофауны. Без камней. Без керамики. Нижняя граница волнистая, переход ясный по цвету и структуре.

AC 20–35 см. Постепенное изменение цвета от буровато-серого до желто-бурого. Тяжелый суглинок призмовидно-глыбистой структуры с вертикальной делимостью. Плотный. Влажно-ват. С глубины 35 см залегает почвообразующая порода – мергель.

Разрез 2

Заложен в центральной части склона в зоне эрозии и транзита эрозионного материала. В профиле выделяются горизонты:

AU 0–27 см. Темно-серый – до черного во влажном состоянии (на препарированной и не препарированной стенке). Легкий суглинок комковато-зернистой структуры. Легкие блески от включений слюды. Свежий. Слабо уплотнен. На поверхности дернина 4–5 см. Присутствуют корни и норы почвенной мезофауны. Без камней. Присутствует керамика кобанской культуры. Нижняя граница затечная, слабоволнистая, зоогенная. Переход ясный по цвету и структуре.

[P1] 27–47 см. Серовато-бурый на препарированной и не препарированной стенке. Средний суглинок комковато-призмовидной структуры. Влажноват, уплотнен. Единичные корни и норы почвенной мезофауны. Без камней. Присутствует в большом количестве керамика кобанской культуры. Переход постепенный по цвету и сложению.

[P2] 47–70 см. Буро-серый до темно-серого. Заметно темнее вышележащего горизонта. Тяжелый суглинок призмовидно-глыбистой структуры. Влажноват. Уплотнен. Единичные корни. Карбонатных новообразований нет. Присутствует кера-

мика кобанской культуры. Переход постепенный по цвету и структуре.

[AB] 70–95 см. Постепенное изменение цвета от буровато-серого до желто-бурого. Тяжелый суглинок призмовидно-глыбистой структуры. Плотный. Влажноват. С глубины 95 см залегает почвообразующая порода – элюво-делювий известковых песчаников.

Разрез 3

Заложен в нижней части склона в аккумулятивной области. Разрез располагался вблизи стены, ограждающей поселение в зоне наиболее благоприятной для земледелия.

AU 0–25 см. Темно-серый до черного. Легкий суглинок комковато-зернистой структуры. Одинаковый на препарированной и не препарированной стенке. Свежий, слабо уплотнен. С поверхности задернован, мощность дернины до 3–4 см. Присутствуют корни и норы почвенной мезофауны. Без камней. Нижняя граница ровная, переход ясный по цвету и структуре, хорошо заметен на заглаженной стенке. В горизонте обнаружена керамика кобанской культуры.

[P1] 25–40 см. Серо-бурый, на препарированной стенке черный. Средний суглинок непрочно комковато-призмовидной структуры. Плотный. Влажноват. Единичные корни. В нижней части горизонта заметна тенденция к вертикальной делимости. В большом количестве содержится керамика кобанской культуры. Единичные магистральные корни. Нижние границы ровные. Переход ясный по цвету и структуре. Предположительно погребенный пахотный горизонт.

[AB] 40–70 см. Черный на препарированной и заглаженной стенке. Средний суглинок призмовидно-глыбистой структуры с хорошо выраженной вертикальной делимостью (в сохранившейся нижней части профиля). Плотный, влажноват. Керамики нет. Нижняя граница слабоволнистая. Переход ясный по цвету и неоднородности материала.

[BC] 70–85 см. Неоднородный по цвету с многочисленными включениями мелких карбонатных морфонов. Средний суглинок глыбистой структуры. Переход по цвету от серого до палевого, белесовато-палевого.

С глубины 85 см залегает почвообразующая порода элюво-делювий известковых песчаников с единичными включениями камней.

Археологический шурф на территории поселения

Археологический шурф заложен в области тальвега в зоне с максимально выраженными условиями для накопления мелкозема.

В профиле выделяется горизонт **AU 0–30 см:** темно-серый – до черного во влажном состоянии;

легкий суглинок порошистой структуры. Дернина слабая, до 3 см. Камней нет. Нижняя граница слабоволнистая. Переход заметный по цвету и по появлению камней. С глубины 25–30 см начинается культурный слой поселения.

В культурном слое выделяется восточная часть, где заполнение серое, неоднородное, с многочисленными включениями камней. В западной части заполнение более однородное, с буроватым оттенком, легкосуглинистое, бесструктурное.

В почвенных разрезах проводили морфолого-генетическое описание профилей и отбор образцов на химические и микробиологические анализы с соблюдением условий стерильности. В отобранных образцах магнитную восприимчивость измеряли с помощью каппаметра КТ-5. Оценку содержания органического углерода в сухом веществе проводили методом влажного окисления со спектрофотометрическим окончанием по Тюрину (Воробьева, 1998). Содержание органических и минеральных форм фосфора определялось по методу Сандерса и Вильямса (Saunders, Williams, 1955). Биомассу активных микробных клеток, дающих респираторный отклик на внесение глюкозы, оценивали методом субстрат-индуцированного дыхания (Anderson, Domsch, 1978). Биомассу живых клеток определяли по содержанию фосфолипидов в почвах (Frostegård et al., 1991; Findlay, 1996) с последующим пересчетом на микробный углерод с использованием коэффициента для пересчета – 190 мкмоль фосфатов фосфолипидов на 1 г органического углерода (Хомутова и др., 2017). УА определяли с помощью индофенольного метода (Kandeler, Gerber, 1988). ФА почв оценивали методом Галстяна–Арутюнян (Хазиев, 2005).

Статистическую обработку данных проводили методом главных компонент в программе Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На территории поселения фрагменты керамики найдены во всех слоях археологического шурфа. Встречаемость керамики на поселении на порядок выше, чем в почвах потенциальной экономической зоны (табл. 1).

В почвах на склонах распределение керамики существенно различалось. Так, в верхней части склона, в зоне эрозии, керамики не обнаружено. По-видимому, при распашке в древности эрозия на этом участке была максимальной, что и обусловило полную потерю мелкозема и археологического материала. В средней части склона (область тылового шва склона) шло активное накопление эрозийного материала, в результате чего сформировался мощный профиль почвы с многочисленными включениями археологического материала в слоях до глубины 60 см. В

Таблица 1. Содержание керамики в культурном слое и почвах потенциальной экономической зоны поселения Арбакол-1

Глубина, см	Вес керамики, г
Верхняя часть склона	
0–20	0
20–40	0
Средняя часть склона	
0–20	8
20–40	63
40–60	96
60–70	0
70–80	0
80–100	0
100–120	0
Нижняя часть склона	
0–20	64
20–40	58
40–60	0
60–70	0
70–80	0
Культурный слой	
0–20	557
20–40	871
40–60	930

нижней части склона, который приурочен к более пологому участку, аккумуляция эрозионного материала протекала с меньшей скоростью, и керамика обнаружена в слое до 40 см. В целом, присутствие керамики в почвах на склоне выше поселения однозначно указывает на распашку и внесение удобрений в древности.

На рис. 2 представлены физико-химические свойства культурного слоя поселения Арбакол-1 и почв потенциальной экономической зоны вокруг поселения. В верхней части каждого почвенного профиля уровни содержания органиче-

ского углерода ($C_{орг.}$) и органического фосфора ($P_{орг.}$) с глубиной снижались.

На глубине 45–65 см в почвенных профилях средней и нижней части склона выявлено увеличение $C_{орг.}$, тогда как показатель $P_{орг.}$ возрастал на этой глубине только в нижней части склона. Высокий уровень этих параметров в глубоких слоях почв обусловлен сельскохозяйственным использованием территории и внесением органических удобрений в древности, что подтверждается присутствием керамики кобанской культуры в почвенных разрезах. Максимальные уровни и органических, и минеральных форм фосфора отмечены в профиле шурфа на территории поселения. В верхней части профиля шурфа показатель $P_{орг.}$ в 2–8, а $P_{мин.}$ (минерального фосфора) в 4–12 раз выше, по сравнению с почвами склона. В нижней части профиля шурфа уменьшение содержания органических форм фосфора сопровождалось увеличением содержания его минеральных форм.

Наибольшие величины магнитной восприимчивости почв выявлены также на территории поселения. В почвах потенциальной экономической зоны значения данного показателя возрастали по мере приближения к поселению так же, как и значения содержания $P_{мин.}$

На рис. 3 представлена биологическая активность культурного слоя и почв потенциальной экономической зоны поселения Арбакол-1. Максимальные величины содержания углерода микробной биомассы, оцененной по количеству фосфолипидов (С-ФЛ), и углерода биомассы микробных клеток, дающих дыхательный отклик на внесение глюкозы (С-СИД), отмечены в верхней части профиля шурфа на территории поселения. С глубиной значения С-СИД заметно снижались и выравнивались. Значения С-ФЛ в глубоких слоях почвенных профилей в средней и нижней частях склона демонстрировали пики на глубинах от 60 до 80 см, что связано со следами распашки и внесением удобрений в древности. Особенно высокий пик содержания С-ФЛ наблюдался на территории поселения на глубине 45 см.

Максимальная ФА выявлена в верхнем горизонте почвы в разрезе 1. В нижних горизонтах значения данного показателя на всех участках сходны, кроме наиболее глубокого слоя шурфа, где наблюдалось заметное увеличение ФА.

УА на территории поселения – почти в два раза выше, чем в почвах потенциальной экономической зоны, что сопоставимо с присутствием керамики кобанской культуры. Однако в верхней части склона выявлены достаточно высокие величины УА, что в данном случае, по-видимому, связано с современным выпасом скота.

Статистический анализ биологической активности почв в окрестностях поселения Арбакол-1

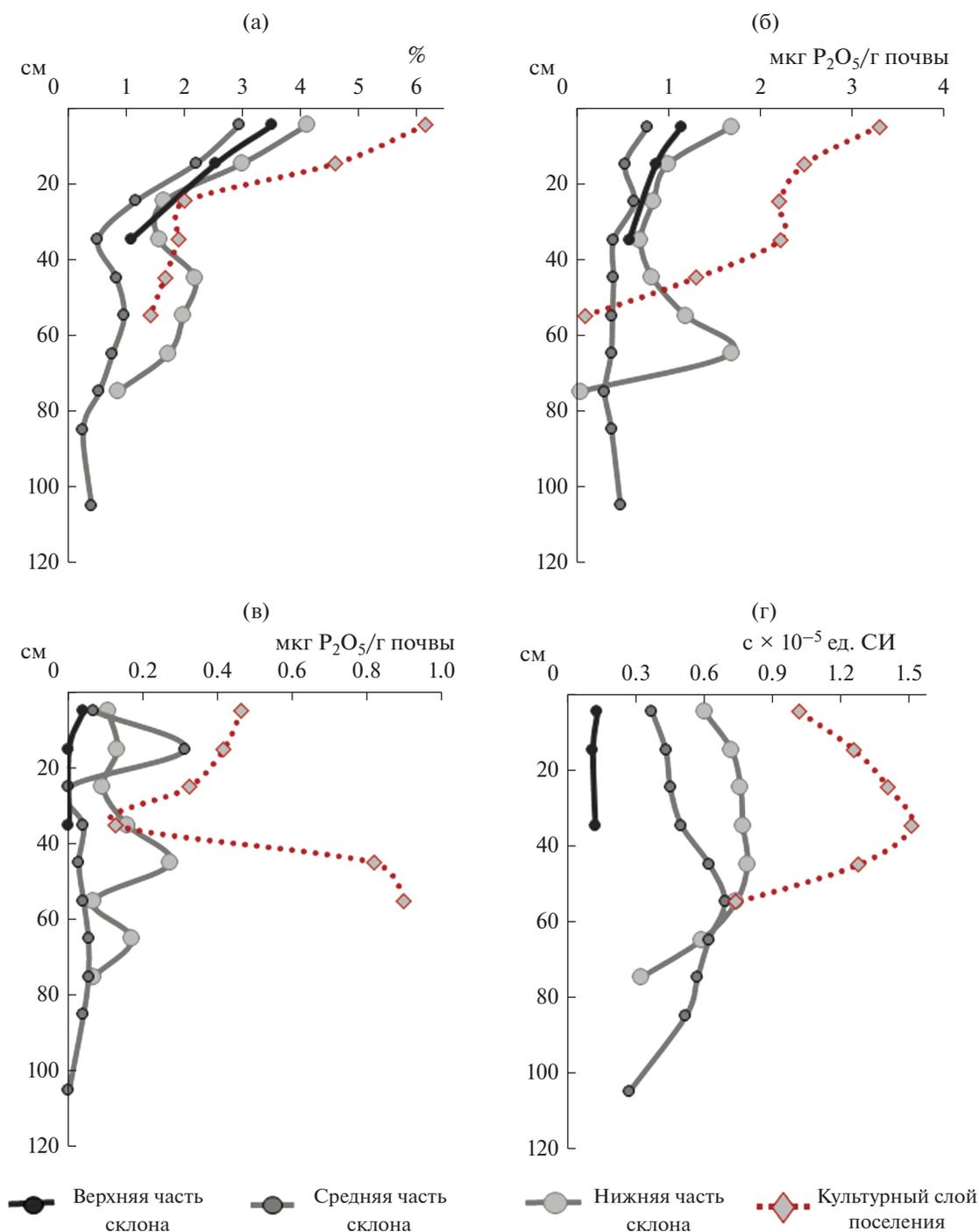


Рис. 2. Физико-химические свойства культурного слоя и почв потенциальной экономической зоны поселения Арбакол-1: (а) – содержание органического углерода ($C_{орг.}$), (б) – содержание органического фосфора ($P_{орг.}$), (в) – содержание минерального фосфора ($P_{мин.}$), (г) – магнитная восприимчивость.

проводился с помощью метода главных компонент (рис. 4). Большая часть показателей биологической активности почв ($C_{орг.}$, С-ФЛ, С-СИД, ФА, УА) преимущественно связана с осью 1, смещающая координаты объектов в положительную об-

ласть по оси ОХ (рис. 4). Коэффициенты корреляции между этими характеристиками варьировали от 0.63 до 0.90. Физико-химические показатели антропогенной нагрузки (магнитная восприимчивость, $P_{мин.}$, содержание керамики) бы-

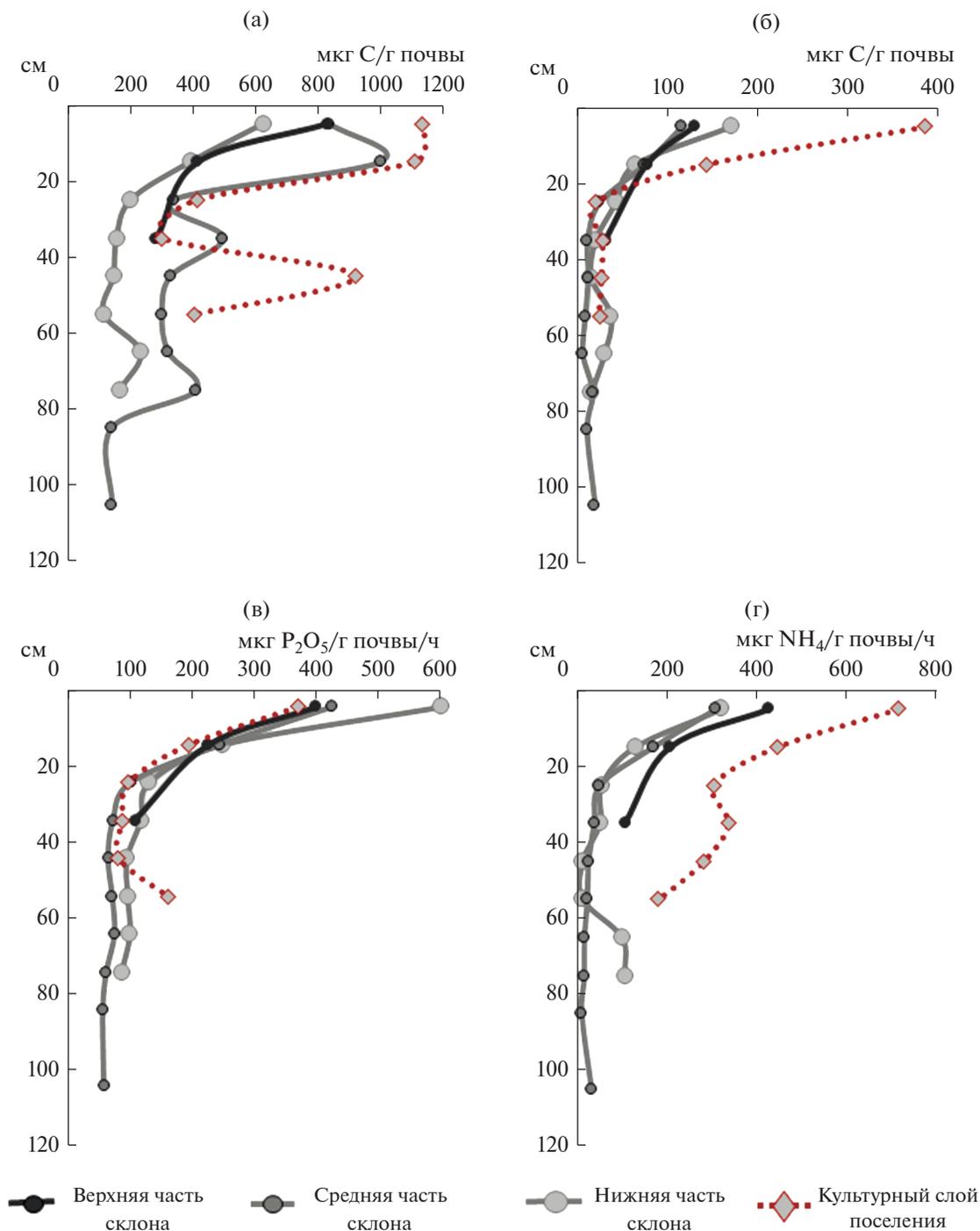


Рис. 3. Биологическая активность культурного слоя и почв потенциальной экономической зоны поселения Арбакол-1: (а) – углерод микробной биомассы, рассчитанный по содержанию почвенных фосфолипидов, (б) – углерод микробной биомассы, рассчитанный по скорости субстрат-индуцированного дыхания, (в) – фосфатазная активность, (г) – уреазная активность.

ли преимущественно связаны с осью 2 и смещали координаты объектов в отрицательную область по оси ОУ. Коэффициенты корреляции между этими характеристиками варьировали от 0.74 до 0.78.

Диаграмма рассеяния (рис. 4б) выявила особенно заметные различия между верхними и нижними почвенными горизонтами на территории поселения. В верхних горизонтах здесь отмечены макси-

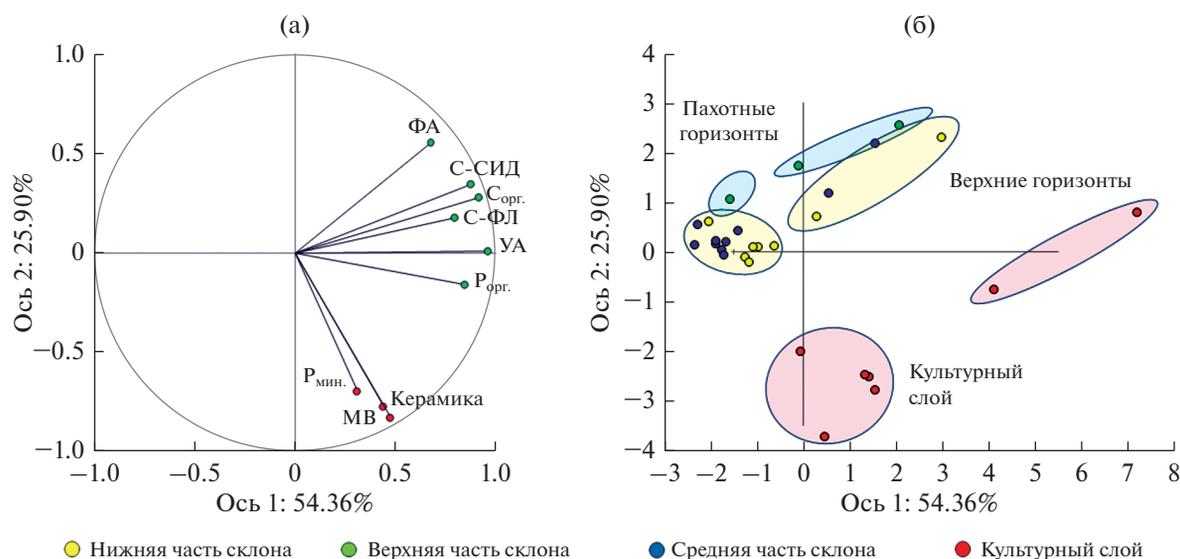


Рис. 4. Результаты статистического анализа почв катенарного сопряжения в окрестностях поселения Арбакол-1 (а) и культурного слоя этого поселения (б) (факторный анализ, метод главных компонент): Р_{орг.} — органический фосфор, Р_{мин.} — минеральный фосфор, С_{орг.} — органический углерод, С-ФЛ — углерод микробной биомассы, рассчитанный по содержанию почвенных фосфолипидов, С-СИД — углерод микробной биомассы, рассчитанный по скорости субстрат-индуцированного дыхания, ФА — фосфатазная активность, УА — уреазная активность, МВ — магнитная восприимчивость.

мальные величины почти всех показателей биологической активности, тогда как наибольшие величины физико-химических характеристик описывали нижнюю часть профиля археологического шурфа. На склоне в средней и, особенно, в нижней частях уровень физико-химических показателей подповерхностных пахотных горизонтов в большей степени приближен к уровню на территории поселения, по сравнению с верхней частью склона, где основное влияние оказывали микробиологические характеристики почв и их ферментативная активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участок потенциальной экономической зоны в окрестностях поселения Арбакол-1 в верхней части склона практически не сохранил следов древнего земледелия в силу эрозионных процессов, которые резко активизировались при распашке. Достаточно высокие значения уреазной активности в данном случае связаны с современным выпасом скота.

В средней и нижней частях склона создавались наиболее благоприятные условия для роста почвенного профиля и накопления эрозионного материала. При этом происходила естественная консервация следов земледельческого освоения территории: керамики, живой микробной биомассы, содержания фосфатов и, в меньшей степени, магнитной восприимчивости. Такие биологические показатели, как ферментативная активность и ве-

личина С-СИД, не отражают факта земледельческого освоения территории в эпоху бронзы.

В культурном слое на территории поселения отмечены наиболее высокая встречаемость фрагментов керамики и максимальные значения всех исследованных параметров, за исключением фосфатазной активности, что связано с высоким содержанием минеральных форм фосфора.

В целом, микробиологические исследования содержащих керамику почв поселений и их окрестностей позволяют подтвердить факт антропогенного освоения территории в прошлом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Статья подготовлена в соответствии с Госзаданием № 0191-2019-0046 “Развитие почв в условиях меняющейся среды и антропогенных воздействий”. Полевые исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-09-00615. Аналитический блок выполнен при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-18-00406.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдусаламова Р.Р., Баламирзоева З.М.* Сравнительный анализ распространения горных почв в России // Вестн. соц. пед. инст. 2020. № 2 (34). С. 19–34.
- Алексеев А.О., Митенко Г.В., Шарый П.А.* Количественные оценки палеоэкологических изменений в позднем голоцене на юге Восточно-Европейской равнины на основе магнитных свойств почв // Почвоведение. 2020. № 12. С. 1425–1435. <https://doi.org/10.31857/S0032180X20120023>
- Аличаев М.М., Казиев М.Р.А.* Древние террасовые системы земледелия в горах Дагестана и возвращение их в практику современного сельскохозяйственного производства // Эффективное развитие горных территорий России / Мат. междунаrod. науч.-практ. конф., Махачкала, 26–29 июля 2016 г. Махачкала: ДГУНХ, 2016. С. 284–288.
- Борисов А.В., Коробов Д.С.* Древнее и средневековое земледелие в Кисловодской котловине: итоги почвенно-археологических исследований. М.: ТАУС, 2013. 272 с.
- Борисов А.В., Каширская Н.Н., Ельцов М.В. и др.* Почвы древних сельскохозяйственных террас Восточного Кавказа // Почвоведение. 2021а. № 5. С. 542–557. <https://doi.org/10.31857/S0032180X2105004X>
- Борисов А.В., Демкина Т.С., Каширская Н.Н. и др.* Биологическая память почв об изменениях условий почвообразования и антропогенной деятельности в прошлом: микробная и ферментная составляющие // Почвоведение. 2021б. № 7. С. 849–861. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21070029>
- Воробьева Л.А.* Химический анализ почв. М.: МГУ, 1998. 272 с.
- Воскова А.В., Гуня А.Н., Караваев В.А., Марьянских Д.М.* Землепользование и возможности регулирования антропогенной нагрузки на горные ландшафты северного макросклона Большого Кавказа (на примере долины р. Карасу) // Устойч. разв. гор. тер. 2021. Т. 13. № 1. С. 16–24. <https://doi.org/10.21177/1998-4502-2021-13-1-16-24>
- Караваев В.А., Опекунова М.Ю., Солодянкина С.В., Вантеева Ю.В.* Количественная оценка антропогенной нарушенности различных участков Приольхонья и ее связь с водной эрозией // Устойч. разв. гор. тер. 2020. Т. 12. № 1. С. 45–54. <https://doi.org/10.21177/1998-4502-2020-12-1-45-54>
- Каширская Н.Н., Плеханова Л.Н., Чернышева Е.В. и др.* Пространственно-временные особенности фосфатазной активности естественных и антропогенно-преобразованных почв // Почвоведение. 2020. № 1. С. 89–101.
- Каширская Н.Н., Чернышева Е.В., Хомутова Т.Э. и др.* Археологическая микробиология: теоретические основы, методы и результаты // Рос. археол. 2021. № 2. С. 7–18.
- Коробов Д.С.* Система расселения алан Центрального Предкавказья в I тыс. н.э. Т. 2. Каталог поселений. М., СПб.: Нестор-История, 2017. 312 с.
- Коробов Д.С., Борисов А.В.* Новые данные по изучению ресурсных зон древних и средневековых поселений в Кисловодской котловине // Рос. археол. 2020. № 4. С. 53–69. <https://doi.org/10.31857/S086960630008885-2>
- Лисецкий Ф.Н.* Агрогенная трансформация почв сухостепной зоны под влиянием античного и новейшего землеустройства // Почвоведение. 2008. № 8. С. 913–927.
- Потапова А.В., Пинской В.Н., Гак Е.И. и др.* Изменчивость свойств культурного слоя поселения эпохи бронзы Ксизово-1 в лесостепном Подонье // Рос. археол. 2020. № 1. С. 60–75.
- Русеева З.М.* Агроклиматические ресурсы Ставропольского края. Л.: Гидрометеиздат, 1971. 238 с.
- Татаринцев В.Л., Татаринцев Л.М., Мацюра А.В., Бондарович А.А.* Организация устойчивого сельскохозяйственного землепользования на основе ландшафтного анализа // Устойч. разв. гор. тер. 2020. Т. 12. № 3. С. 339–348. <https://doi.org/10.21177/1998-4502-2020-12-3-339-348>
- Фетисов Д.М.* Развитие землепользования и изменение антропогенной нагрузки на территории российского Приамурья // Устойч. разв. гор. тер. 2014. Т. 6. № 2. С. 69–75.
- Хазиев Ф.Х.* Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.
- Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., Каширская Н.Н., Демкин В.А.* Фосфатазная активность современных и погребенных каштановых почв Волго-Донского междуречья // Почвоведение. 2012. № 4. С. 478–483.
- Хомутова Т.Э., Демкина Т.С., Борисов А.В., Шишлина Н.И.* Состояние микробных сообществ подкурганых палеопочв пустынно-степной зоны эпохи средней бронзы (XXVII–XXVI вв. до н. э.) в связи с динамикой увлажненности климата // Почвоведение. 2017. № 2. С. 239–248.
- Чернышева Е.В., Каширская Н.Н., Коробов Д.С., Борисов А.В.* Биологическая активность дерново-карбонатных почв и культурных слоев аланских поселений Кисловодской котловины // Почвоведение. 2014. № 9. С. 1068–1076.
- Чернышева Е.В., Борисов А.В., Коробов Д.С.* Биологическая память почв и культурных слоев археологических памятников. М.: ГЕОС, 2016. 240 с. ISBN 978-5-89118-729-0. http://www.benran.ru/rffi_exp/izd1_v.aspx
- Шеуджен А.Х., Харитонов Е.М., Галкин Г.А., Тхакушинов А.К.* Зарождение и развитие земледелия на Северном Кавказе / Ред. А.Х. Шеуджен. Майкоп: Адыгея, 2001. 952 с.
- Anderson J.P.E., Domsch K.H.* A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils // Soil Biol. Biochem. 1978. V. 10. № 3. P. 215–221.
- Bintliff J.L.* The concepts of “site” and “offsite” archaeology in surface artefact survey // Non-destructive techniques applied to landscape archaeology / Eds M. Pasquinucci, F. Tremen. Oxford: Oxbow, 2000. P. 200–215.

- Borisov A., Kashirskaya N., Korobov D., Sergeev A.* Traces of ancient agriculture in the soil around the archaeological sites (a case study from Northern Caucasus, Russia) // *Quat. Internat.* 2020. V. 618. P. 4–13.
- Cerdà A., Rodrigo-Comino J., Novara A. et al.* Long-term impact of rainfed agricultural land abandonment on soil erosion in the Western Mediterranean basin // *Progr. Phys. Geogr. Earth Envir.* 2018. V. 42. № 2. P. 202–219. <https://doi.org/10.1177/0309133318758521>
- Chernysheva E.V., Khomutova T.E., Borisov A.V., Korobov D.S.* Urease activity in cultural layers at archaeological sites // *J. Archaeol. Sci.* 2015. V. 57. P. 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2015.01.022>
- Chernysheva E., Borisov A., Korobov D.* Thermophilic microorganisms in arable land around medieval archaeological sites in Northern Caucasus, Russia: novel evidence of past manuring practices // *Geoarchaeology.* 2017. V. 32. P. 494–501. <https://doi.org/10.1002/gea.21613>
- Chernysheva E., Khomutova T., Kuznetsova T. et al.* Effects of long-term medieval agriculture on soil properties: a case study from the Kislovodsk basin, Northern Caucasus, Russia // *J. Mount. Sci.* 2018. V. 15. № 6. P. 1171–1185. <https://doi.org/10.1007/s11629-017-4666-7>
- Chernysheva E., Khomutova T., Borisov A. et al.* Soil microbiological properties in livestock corrals: an additional new line of evidence to identify livestock dung // *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2021. V. 37. P. 103012. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2021.103012>
- Dick R.P., Sandor J.A., Eash N.S.* Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley, Peru // *Agricult. Ecosyst. Environ.* 1995. V. 50. № 2. P. 123–131. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90131-7)
- Ding S., Lange M., Lipp J. et al.* Characteristics and origin of intact polar lipids in soil organic matter // *Soil Biol. Biochem.* 2020. V. 151. Iss. 108045. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108045>
- Fassbinder J., Stanjek H.* Occurrence of biogenic magnetic bacteria in soils from archaeological sites // *Archaeologia Polona.* 1993. V. 31. P. 117–128.
- Findlay R.H.* The use of phospholipid fatty acids to determine microbial community structure // *Molecular microbial ecology manual. Ch. 7.* / Eds A.D.L. Akkermans, J.D. Elsas, F.J. Bruijn. Dordrecht: Springer Science and Business Media, 1996. P. 77–93. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0215-2_7
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E.* Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content // *J. Microbiol. Meth.* 1991. V. 14. № 3. P. 151–163. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90018-L](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90018-L)
- Heckmann M.C.* Soil erosion history and past human land use in the North Pare mountains. A geoarchaeological study of slope deposits in NE Tanzania. PhD thesis. Univ. of York, 2011. 270 p.
- Holliday V.T., Gartner W.G.* Methods of soil P analysis in archaeology // *J. Archaeol. Sci.* 2007. V. 34. № 2. P. 301–333. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.05.004>
- Ivanova A., Marfenina O.* Soil fungal communities as bioindicators of ancient human impacts in medieval settlements in different geographic regions of Russia and Southwestern Kazakhstan // *Quatern. Int.* 2015. V. 365. P. 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2014.10.016>
- Kashirskaya N., Zhurbin I., Potapova A. et al.* Soil-microbiological approaches to identifying the boundaries of archaeological sites // *Int. Multidiscipl. Sci. GeoConf. “Surveying Geology and Mining Ecology Management”, SGEM, Sofia, 16–22 August, 2021. Sofia: SGEM, 2021. P. 515–522.*
- Kandeler E., Gerber H.* Short-term assay of urease activity using colorimetric determination of ammonium // *Biol. Fertil. Soils.* 1988. V. 6. № 1. P. 68–72.
- Lisetskii F.N., Rodionova M.E., Terekhin E.A. et al.* Post-agrogenic evolution of soils in ancient Greek land use areas in the Herakleian Peninsula, Southwestern Crimea // *The Holocene.* 2013. V. 23. № 4. P. 504–514.
- Margesin R., Siles J., Cajthaml T. et al.* Microbiology meets archaeology: soil microbial communities reveal different human activities at archaic Monte Iato (Sixth Century BC) // *Microb. Ecol.* 2017. V. 73. P. 925–938. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0904-8>
- Mohammed S., Abdo H.G., Szabó S. et al.* Estimating human impacts on soil erosion considering different hillslope inclinations and land uses in the coastal region of Syria // *Water.* 2020. V. 12. № 10. P. 2786. <https://doi.org/10.3390/w12102786>
- Nannipieri P., Kandeler E., Ruggiero P.* Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil // *Enzymes in the environment. Activity, ecology and applications* / Eds R.G. Burns, R.P. Dick. N.Y.: Marcel Dekker, 2002. P. 1–33.
- Peters S., Thiemeyer H., Borisov A. et al.* Microbial characteristics of soils depending on the human impact on archaeological sites in the Northern Caucasus // *Quat. Internat.* 2014. V. 324. P. 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2013.11.020>
- Saunders W.M.H., Williams E.G.* Observations on the determination of total organic phosphorus in soils // *J. Soil Sci.* 1955. V. 6. № 2. P. 254–267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1955.tb00849.x>
- Sandor J.A., Eash N.S.* Ancient agricultural soils in the Andes of Southern Peru // *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1995. T. 59. № 1. C. 170–179.
- Skujins J.J.* Extracellular enzymes in soil // *Crit. Rev. Microbiol.* 1976. V. 4. P. 383–421.
- Smekalova T., Bevan B., Kashuba M. et al.* Magnetic surveys locate Late Bronze Age corrals // *Archaeol. Prospect.* 2020. V. 28. P. 3–16. <https://doi.org/10.1002/arp.1789>
- van Loo M., Duser B., Verstraeten G. et al.* Human induced soil erosion and the implications on crop yield in a small mountainous Mediterranean catchment (SW-Turkey) // *Catena.* 2017. V. 149. № 14. P. 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.08.023>
- Wilkinson T.J.* The definition of ancient manured zones by means of extensive sherd-sampling techniques // *J. Field Archaeol.* 1982. T. 9. № 3. P. 323–333. <https://doi.org/10.1179/009346982791504616>
- Wilson C.A., Davidson D.A., Cresser M.S.* An evaluation of multielement analysis of historic soil contamination to differentiate space use and former function in and

- around abandoned farms // *The Holocene*. 2005. T. 15. № 7. P. 1094–1099.
- Zhang Y., Zheng N., Wang J. et al. High turnover rate of free phospholipids in soil confirms the classic hypothesis of PLFA methodology // *Soil Biol. Biochem.* 2019. V. 135. P. 323–330.
https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.023
- Zhang Y., Sun G., Yang Y., Wu X. Reconstruction of the use of space at Tianluoshan, China, based on palynological and lipid evidence // *Environ. Archaeol.* 2020. P. 1–13.
https://doi.org/10.1080/14614103.2020.1829299
- Zhurbin I., Borisov A. Non-destructive approach for studying medieval settlements destroyed by ploughing: combining aerial photography, geophysical and soil surveys // *Archaeol. Prospect.* 2020. V. 27. P. 343–360.
https://doi.org/10.1002/arp.1778
- Zuazo V.D., Martínez J.F., Pleguezuelo C.R. et al. Soil-erosion and runoff prevention by plant covers in a mountainous area (SE Spain): implications for sustainable agriculture // *Environmentalist.* 2006. V. 26. № 4. P. 309–319.
https://doi.org/10.1007/s10669-006-0160-4

Traces of Ancient Anthropogenic Activity in the Soils (on the Example of the Bronze Age Settlement Arbakol-1 in the Kislovodsk Basin)

A. A. Petrosyan^a*, T. E. Khomutova^a, N. N. Kashirskaya^a, D. S. Korobov^b, and A. V. Borisov^a

^a*Institute of Physicochemical and Biological Problems of Soil Science, Russian Academy of Sciences, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia*

^b*Institute of Archaeology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: Alisa_mayakovskaya@bk.ru

The purpose of this work was to identify traces of ancient anthropogenic activity by assessing the biological activity of the cultural layers of settlement Arbakol-1 of the Bronze Age in the soil catena vicinity of Kislovodsk. One soil section on the territory of the settlement at the foot of the slope and three soil sections in the potential economic zone of the settlement in the upper, middle and lower part of the slope were studied. In the soil profiles, the content of ceramics in cultural layers was evaluated, the physicochemical properties (magnetic susceptibility, organic carbon content, organic and mineral forms of phosphorus) and biological activity (biomass of active microbial cells that give a respiratory response to the introduction of glucose, the abundance of living microbial cells, phosphatase and urease activity) were evaluated. The site of a potential economic zone near the settlement of Arbakol-1 in the upper part of the slope has practically preserved no traces of ancient agriculture due to erosion processes that have sharply intensified during plowing. Rather high values of urease activity in this case are probably associated with modern cattle grazing. In the middle and lower part of the slope, the most favorable conditions existed for the growth of the soil profile and the accumulation of erosive material. At the same time, there was a natural conservation of traces of agricultural development of the territory: ceramics, living microbial biomass, phosphate content, and, to a lesser extent, magnetic susceptibility. Such biological indicators as the enzymatic activity and the biomass of active microorganisms that give a respiratory response to the introduction of glucose do not reflect the fact of agricultural development of the territory in the Bronze Age. In the cultural layer on the territory of the settlement, the highest occurrence of ceramic fragments and the maximum values of all the studied parameters are shown, with the exception of phosphatase activity what is related to the high content of mineral forms of phosphorus.

Keywords: soil, traces of anthropogenic impact, microbial biomass, enzymatic activity

УДК 574.42:575.858

РОЛЬ ТРАВЯНЫХ БИОМОВ В ДИВЕРСИФИКАЦИИ НАСЕКОМЫХ-ФИТОФАГОВ

© 2022 г. А. Ф. Сафонкин¹, *, Т. А. Триселева¹, А. А. Яцук¹¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия

*e-mail: andrej-safonkin@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.05.2022 г.

После доработки 02.06.2022 г.

Принята к публикации 07.06.2022 г.

По литературным данным охарактеризована эволюция степной зоны Евразии и описаны общие закономерности эволюции злаков, доминирующих в степных биоценозах. Обсуждена гипотеза, что дивергенция злаков предшествовала возникновению их доминирования в неогене. Рассмотрены факторы, способствующие возникновению насекомых-фитофагов. Приведены гипотезы, объясняющие процессы видообразования у насекомых-фитофагов. Охарактеризованы высшие двукрылые насекомые Chlogoridae, в том числе злаковые мухи рода *Meromyza* Mg., а также массовые, часто доминирующие, виды злаковых экосистем. Определено время возникновения меромиз по участку гена COI мтДНК, в сравнении с *Drosophila*, для которых известно время формирования видов. Сопоставлено время дивергенции кормовых злаков с эволюцией меромиз. Стратегия кормовой специализации на злаках в эволюции меромиз описана на примере группы близких европейских видов, входящих в кластер variegata. Показано, что распространение, диверсификация, переход от поли- к олиго- и монофагии шел вслед за увеличением обилия потенциальных кормовых злаков, что соответствует схеме видообразования, известной как гипотеза колебаний.

Ключевые слова: степные биоценозы, коэволюция насекомое–растение, двукрылые–фитофаги

DOI: 10.31857/S0042132422060072

ВВЕДЕНИЕ

Эволюция Земли определяет процессы адаптации живых систем к постоянно изменяющимся условиям среды. Особое значение в эволюции современной биоты Земли имеет биоразнообразие экосистем. Одной из таких экосистем является степь.

Места обитания с преобладанием травы, которые охватывают луга и степи умеренного климата, тропические саванны и пахотные земли, занимают до 40% поверхности Земли (Gibson, 2009). Степь можно охарактеризовать как природную зону полусухих регионов в пределах прохладных умеренных зон растительности, в которой преобладают устойчивые к засухе ксероморфные травы, многолетние травы и низкие кустарники (Walter, 1968, 1974). Самый крупный степной регион в мире – Евразийская степь – простирается от Венгерского бассейна и дельты Дуная на западе до Амура на востоке, расположен между 48° и 57° с. ш. и между 27° и 128° в. д. (Лавренко и др., 1991). Время формирования степных ландшафтов определяется от палеоцена–эоцена (Авдеев, 2008) до начала миоцена (Быков, 1979). В конце олигоцена появились места обитания с преобладанием травы, которые в неогене стали доминирующими

биомами. В конце миоцена появился новый компонент зональной структуры – зона степи (Величко, 1999). Первые палеоген/ранне-миоценовые степи зафиксированы в Центральной Азии, позднее – в Европе. Около 25 млн лет назад начинается остепнение территории Средней Азии и Казахстана (Авдеев, 2008).

В течение палеоцена–олигоцена и в начале миоцена основные изменения климата, горных хребтов и океанов в Северной Евразии оказали серьезное влияние на происхождение и эволюционную историю степи. Волны глубокого похолодания и потепления в сочетании с увеличением тяжести и продолжительности холодных стадий со среднего плейстоцена оказали воздействие на биоту и физический ландшафт и изменили структуру зонального ландшафта (Hurka, 2019). Во время ледниковых периодов степная растительность распространилась по Северной Евразии, во время межледниковых – леса простирались от Атлантического океана до Охотского моря. Циклические изменения плейстоцена между ледниковыми и межледниковыми периодами привели к расширению видов, адаптированных к холоду, во время ледников и к сокращению – во время межледниковых периодов.

ЭВОЛЮЦИЯ СТЕПНЫХ ЛАНДШАФТОВ

Растительность древней степной зоны Северной Азии зародилась в контакте мезофильной умеренной и ксерофильной субтропической флор (Авдеев, 2009). По анализу молекулярных данных и реконструкции среды обитания предположено, что представители Poales возникли в раннем меловом периоде (118.4 млн л. н.) в солнечной и сухой среде. Злаки сформировались не позднее конца мела (Цвелев, 1987). Подавляющее большинство разнообразия трав приходится на одну из двух клад, так называемых ВЕР (ВОР) с подсемействами Bambusoideae, Ehrhartoideae (Oryzoidea), Poaceae и PASMAD с подсемействами Panicoideae, Aristidoideae, Chloridoideae, Micrairoideae, Arundinoideae и Danthonioideae (Christin et al., 2008; Vincentini et al., 2008). Клада ВЕР включает только травы с фотосинтезом C3, тогда как в кладе PASMAD встречаются травы с фотосинтезом C3 и C4 (Kellogg, 2015). На основе изучения фитолитов предположено, что линии ВЕР и PASMAD разделились в позднем меловом периоде (Strömberg, 2011). Причем именно эволюция и последующая экологическая экспансия трав Poaceae с позднего мелового периода привели к созданию одного из доминирующих биомов Земли (Strömberg, 2011). Травы с фотосинтезом C3 доминируют в высоких широтах, в определенных высотных поясах и при высоком давлении углекислого газа, а также в климате с осадками в прохладный сезон. Большинство трав евразийской степи — это травы подсемейства Poaceae с фотосинтезом C3 (Hurka, 2019). В той же работе предположено, что травы C3 и C4 присутствовали и их видообразование шло во многих районах за миллионы лет до того, как они стали доминирующими в местах обитания с открытой травой. Несмотря на то, что Северная и Центральная Европа оставались в значительной степени покрытыми лесами на протяжении всего кайнозоя (Kovar-Eder et al., 2008), травы становятся доминирующими в Южной Европе и Малой Азии уже начиная с миоцена. Если в середине олигоцена среди травянистых преобладало разнотравье, то в миоцене на злаки приходилось уже 50–60%, а в конце плиоцена — 60–90% (Авдеев, 2008).

Предположительно, эволюция злаковых шла от луговых многолетних мезофильных корневищных видов — пырей ползучий *Elytrigia repens* (L.) Desv. ex Nevski, 1933, овсяница луговая *Festuca pratensis* Huds — к рыхлокустовым — мятлики *Poa* L., 1753 (Проханов, 1965). Поэтому на лугах преобладают фитоценозы из корневищных злаков и разнотравья (Проханов, 1965; Чибилев, 1992), в степях распространены фитоценозы злаков *Stipa* L., 1753, *Festuca* L., 1753, *Agropyron* Gaertn., *Koeleria* Pers. 1805, *Helictotrichon* Besser, 1827, *Poa*, имеющих узкие длинные листовые пластины (препят-

ствующие интенсивному испарению влаги) и образующих у основания дерновину (Грошева, 2020).

Разнообразие флоры определяется не только макро-, но и микробиотопическими особенностями территории. Конфигурация окружающего ландшафта, например его неоднородность и фрагментация среды обитания, действует как видовой фильтр, который определяет региональный пул видов и контролирует поток семян (Parmesan, 2006; Gaujour et al., 2012). Именно в неоднородном ландшафте формируются рефугиумы и микрорефугиумы — места, в которых могут поддерживаться популяции видов животных, связанных с определенной растительностью, при сокращении ареалов во время неблагоприятных климатических периодов (Hewitt, 1999; Homburg et al., 2013; Nylander et al., 2015).

ФИТОФАГИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ НАСЕКОМЫХ

Огромное значение для травяных биомов приобретает коадаптация доминирующих в растительном покрове злаков и фитофагов. Значительный подъем фитофагии произошел в конце палеогена — начале неогена именно с распространением открытых ландшафтов и злаковников на всех континентах (Пономаренко, 2010). Расширение зоны степей создавало новую экологию регионов и формировало новые комплексы живых организмов, адаптированных к новым условиям. Среди ископаемых фаунистических комплексов при появлении злаков известен палеоцен — нижний эоценовый диноцератовый палеозоокомплекс. В нижнем олигоцене диноцератовый палеозоокомплекс сменился на бронтотериевый. В миоцен — плиоцене (12–2 млн л. н.) продолжались и дальнейшая интенсивная эволюция животных открытых пространных саваннового типа, в частности копытных, и формирование гипарионовой фауны. Известен мамонтовый, или верхнепалеолитический, комплекс. В Евразии, когда в начале плиоцена были распространены лесостепи, роль копытных заключалась в приводящем к воспроизводству степных ценозов выедании опада злаковых трав, препятствующего произрастанию семян (Проханов, 1965). В отсутствие удаления избыточной массы ксерофитные степные дерновинные группировки сменяются короткокорневищными злаками, затем — разнотравьем, нитрофильными видами, появляются кустарники, деревья, формируются лигновые типы группировок (Ткаченко, 2004).

Аналогично комплексам позвоночных животных, в процессе эволюции лугов, лесостепей и степей формировались своеобразные комплексы беспозвоночных. Следует отметить, что биотопические особенности ландшафтов играют определенную роль и в сценариях видообразования. В настоящее время областью интенсивных исследований в эволюционной биологии стало изучение

симпатрического, или экологического, видообразования — возникновение новых видов в результате адаптации к различным экологическим нишам (Rundle, Nosil, 2005; Schluter, 2009; Nosil, 2012). Насекомые-фитофаги представляют собой хорошие модельные системы для изучения этого эволюционного процесса (Drès, Mallet, 2002; Funk et al., 2002; Matsubayashi et al., 2010; Elias et al., 2012; Forbes et al., 2017). Неоднородность территории способствует экологическому видообразованию насекомых, связанных с определенным комплексом растений-хозяев, когда дивергентный естественный отбор, действующий на популяции, населяющие разные среды, приводит к эволюции репродуктивных изолирующих барьеров (Schluter, 1998; Rundle, Nosil, 2005).

Существует ряд гипотез, объясняющих процессы видообразования у насекомых-фитофагов. Гипотеза музыкальных стульев (the musical chairs hypothesis) предполагает, что специализированные насекомые-фитофаги полностью переходят на питание растениями из нового таксона, ограничиваясь новым кругом растений-хозяев (Bruzese et al., 2019). Гипотеза колебаний (the oscillation hypothesis) предполагает, что расширение рациона питания с последующей специализацией на новых видах растений-хозяев постоянно способствует диверсификации насекомых-фитофагов (Janz, Nylin, 2008). Переход к универсальной диете, как правило, открывает новую адаптивную зону, которая способствует захвату новых растений-хозяев. В этом сценарии расширение рациона питания обеспечивается фенотипической пластичностью насекомых, а последующая фрагментация популяций и их специализация на недавно захваченных растениях-хозяевах затем приводят к образованию новых видов (Nylin, Janz, 2009). Следовательно, видообразование — результат эволюции популяций насекомых в направлении использования ограниченного набора растений-хозяев.

ФИТОФАГИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ДВУКРЫЛЫХ НАСЕКОМЫХ

Насекомые, в том числе фитофаги, составляют значительную часть животного населения биоценозов, их численность зависит от состояния не только самих биоценозов, но и ландшафтов, которые они населяют (Багачанова, Нарчук, 2003). Много работ посвящено изменениям ареала у насекомых-фитофагов (Весегга, Venable, 1999; Slove, Janz, 2011), смене растений-хозяев (Nyman et al., 2012; Pitteloud et al., 2017; Sahoo et al., 2017), динамике диверсификации (Kergoat et al., 2018) в связи с изменением климата. Среди высших акаллиптранных двукрылых (Diptera, Acalurtratae) обилием видов и их высокой численностью выделяется семейство Chloropidae, включающее зоо-, сапро- и фитофагов (Нарчук, 1970). Ископаемые остатки

предков злаковых мух Carnoidea известны только из позднего эоцена—олигоцена, и, по-видимому, в олигоцене они были уже многочисленны (Родендорф, 1980; Нарчук, 1987). В семействе Chloropidae представители Oscinellinae эволюционировали в большей мере как осваивавшие разные среды обитания, а Chloropinae — как комменсалы с последующим переходом к полной фитофагии (Нарчук, 1970). Поэтому из 60 родов Chloropinae 2/3 относят к фитофагам (Нарчук, 1987). В ряде работ чрезвычайная диверсификация насекомых-фитофагов объясняется избирательными реакциями на растения-хозяев (Winkler, Mitter, 2008; Janz, 2011). Приобретение личинками хлоропид способности питаться живыми тканями растений определило широкую адаптивную радиацию с освоением разных экологических ниш, причем более других прогрессировала линия развития на однодольных. Развитие личинок внутри растительных тканей послужило предпосылкой для освоения двукрылыми фитофагами аридных ландшафтов.

В настоящее время злаковые экосистемы населены злаковыми мухами, особенно многочисленными в мезофитных условиях (Нарчук, 1987). В подсемействе Chloropinae наиболее продвинутой группой двукрылых, занимающая одно из первых мест по численности в природе и по хозяйственному значению, — это эволюционно молодой род *Meromyza* Meigen, 1830 (Федосеева, 2003). Виды этого рода образуют фоновый, а в период массового лета доминирующий комплекс двукрылых степных и луговых биоценозов. Предполагается, что род возник в миоцене в бореальной зоне и имеет три центра видового разнообразия: Западную, Восточную Палеарктику и Неарктику (Бешовски, 1986). Род состоит из 95 видов, распространенных в Северном полушарии в основном выше 40° с. ш., 1/3 из которых обитает в Западной Палеарктике, а 3 имеют голарктическое распространение (Нарчук, Федосеева, 2011). Для 25 видов, в основном европейской группы меромизы, известны их кормовые предпочтения. Меромизы — это олигофаги или монофаги, развивающиеся на злаках из пяти триб: Poeae и Triticeae (подсемейство мятликовых Pooideae, клада ВЕР), Bromaeae (ВЕР), Nardeae (ВЕР), Arundinarieae (РАСМАД), все с фотосинтезом С3. Причем на первых двух кормится большинство злаковых мух (Сафонкин и др., 2020): 11 видов развиваются на злаках трибы Poeae, 4 — трибы Triticeae, 9 — на злаках из разных триб. На представителях остальных трех триб достоверно известно питание трех и, предположительно, еще двух видов меромиз. Триба Poeae по структуре генома хлоропласта разделяется на 2 клады. На злаках клады 1 (Chloroplast group 1, тип Aveneae) развивается 12 видов, из них только на представителях этой клады — два вида. На злаках клады 2 (Chloroplast group 2, тип Poeae) — 14, только на представителях этой клады — четыре вида.

Время дивергенции эволюционных линий типа *Aveneae* и типа *Poaeae* оценено в 30.6 млн лет (Pimentel et al., 2017). Временной разрыв между началом формирования разнообразия в подсемействе *Pooidae* в среднем эоцене—раннем олигоцене и экологическое доминирование в настоящее время подтверждает гипотезу о том, что дивергенция злаков предшествовала возникновению экологических возможностей для их распространения, связанных с изменением климата в неогене (Strömberg, 2005).

Считается (Бешовски, 1986), что в роде *Meromyza* не было теплолюбивого субтропического комплекса видов в границах Лавразии. Как показано выше, важным периодом для формирования разнообразия злаков с СЗ-типом фотосинтеза является период от среднего до позднего миоцена, во время которого также повсеместно происходило формирование открытых травяных биомов холодного и теплого климата (Spriggs et al., 2014). Именно в этот период, по всей видимости, и возник род *Meromyza*. Данный род возник позже разделения на надтрибы *Triticodae* и *Poodeae*, виды которых и составляют основу питания меромиз.

ДИВЕРГЕНЦИЯ ЗЛАКОВЫХ МУХ

Для реконструкции филогении и определения времени дивергенции различных видов широко используется ген *COI* мтДНК. Скорость дивергенции последовательности данного гена у насекомых варьирует от 1.5 до 4% в 1 млн лет (Brower, 1994; Jamnongluk et al., 2003; Papadopoulou et al., 2010). Время дивергенции с учетом скорости мутации может быть определено только на основании сопоставления полученных данных с известными фактами истории Земли или видами насекомых с известным временем возникновения. Время дивергенции 8 видов дрозофил, в том числе 4 гавайских видов, для которых ранее было установлено время их происхождения на основании данных о времени возникновения Гавайских о-ов (Rowan, Hunt, 1991; Tamura et al., 2004), оценено в 5.1 млн лет (Rowan, Hunt, 1991). Следовательно, скорость дивергенции гена *COI* мтДНК у гавайских видов дрозофил — 2.62% (0.0131 замен на сайт за 1 млн лет). Этот коэффициент близок к среднему значению скорости дивергенции последовательности гена *COI* мтДНК у насекомых — 2.75% (Papadopoulou et al., 2010). Ряд ключевых особенностей биологии и эволюции дрозофил и меромиз близок. Поэтому, экстраполируя полученную информацию о скорости эволюции последовательности данного гена, время существования ближайшего общего предка меромиз определяют от 15.8 до 4.02 млн лет (Сафонкин и др., 2020). В пользу того, что скорость эволюции последовательности могла быть у меромиз, скорее, невысокой и может быть близка к нижнему, а не

к верхнему значению, говорит тот факт, что смена поколений у меромиз идет гораздо медленнее, чем у дрозофил, и составляет всего 1–2 поколения в год. Известно, что виды с более быстрой сменой поколений имеют обычно более высокую скорость эволюции последовательностей (Thomas et al., 2010).

Результаты генетического анализа позволили разделить род *Meromyza* на 8 кластеров (Сафонкин и др., 2016). В одном из кластеров, *variegata*, выделяют 3 эволюционные линии: 1) близкие к предковому гаплотипу *M. variegata* и *M. laeta*; 2) линия *M. mosquensis*; 3) более молодая группа видов *M. femorata*, *M. rufa* и *M. bohémica*. Максимальное время расхождения предков близких кластеров *inornata* и *variegata* и возникновения вида *M. variegata* можно оценить в 6.58 млн лет. Время отхождения линий *M. mosquensis* — 2.27, *M. femorata* — 1.57 млн лет (Triseleva et al., 2021). Данная схема группировки видов ставит вопрос о факторах, способствующих их диверсификации. Известно, что корреляционные отношения между эволюцией растений-хозяев и смена растения-хозяина важны для видообразования фитофагов (Forbes et al., 2017). Предположение, что кормовое растение может быть важным фактором в эволюции группы, позволяет проанализировать виды, входящие в кластер *variegata*, широко распространенные на территории Европы и для которых известны все кормовые злаки (Нарчук, Федосеева, 2011; Safonkin et al., 2020). Количество используемых для завершения развития видов злаков максимально у *M. variegata* (6) и *M. mosquensis* (6–7), меньше у *M. laeta*, *M. femorata*, *M. rufa* (по 3), *M. bohémica* (1) (табл. 1).

Следовательно, близкие к предковым гаплотипам виды злаковых мух *M. mosquensis* и *M. variegata* относятся к олигофагам, то есть узким полифагам. Дальнейшее видообразование в кластере шло по направлению не только разделения пищевых ниш между близкородственными видами путем перехода к питанию злаками других триб (*M. variegata*—*M. laeta*, *M. femorata*—*M. rufa*, *M. bohémica*), но и к переходу на узкую олигофагию и монофагию. Эволюция группы может быть объяснена гипотезой колебаний с переходом от универсальной к специализированной фитофагии. Универсальные диеты должны быть временными и неоднократно исчезать в пользу специализации на ограниченном наборе родственных растений (Nylin et al., 2014). Однако эти результаты не противоречат и аллопатрической гипотезе видообразования, предполагающей, что, если адаптация к различным ареалам растений-хозяев приводит к репродуктивной изоляции и видообразованию, то родственные виды насекомых не должны использовать одинаковые виды растений (Nyman et al., 2010).

Переход к фитофагии для ряда двукрылых насекомых связан с изменением климата в неогене

Таблица 1. Кормовые злаки злаковых мух кластера *variegata* и время происхождения злаков (по: Pimentel et al., 2017)

Триба	Млн лет	Подтриба	Млн лет	Виды злаков	Млн лет	Виды злаковых мух
Poeae	33.5*	Agrostidinae	22*	<i>Agrostis capillaris</i> L.	8.8	<i>M. femorata</i> , <i>M. laeta</i> , <i>M. mosquensis</i>
				Aveninae	<i>Koeleria cristata</i> (L.) Pers.	7.2
		<i>Avena sativa</i> L.	9.1		<i>M. variegata</i>	
		Poinae	27*	<i>Phleum pratense</i> L., <i>Ph. phleoides</i> (L.) H. Karst.	—	<i>M. rufa</i> , <i>M. variegata</i>
				<i>Alopecurus pratensis</i> L.	9.2	<i>M. mosquensis</i> , <i>M. variegata</i>
				<i>Poa</i> sp., <i>Poa pratensis</i> L.	9.4	<i>M. mosquensis</i>
		Loliinae	27*	<i>Festuca ovina</i> L.	3.6	<i>M. mosquensis</i>
				<i>Festuca rubra</i> L.	1.8–3.3	<i>M. femorata</i> , <i>M. laeta</i> , <i>M. mosquensis</i>
				<i>Festuca pratensis</i> Huds.	—	<i>M. variegata</i>
				<i>Lolium perenne</i> L.	2.9	<i>M. bohémica</i>
Dactylidinae	8	<i>Dactylis glomerata</i> L.	4.3	<i>M. femorata</i> , <i>M. variegata</i>		
Triticeae	Hordeinae	16	<i>Elymus repens</i> (L.) Gould	8	<i>M. mosquensis</i> ?, <i>M. variegata</i>	
			<i>Elymus hispidus</i> (Opiz) Melderis	8	<i>M. mosquensis</i>	

Примечание: * – время расхождения линий; “—” – данных нет; “?” – предположительно.

и с возможностью формирования новых пищевых связей. На другой группе двукрылых – дрозофилах – показано, что их эволюция коррелирует с понижением температуры палеоклимата и фрагментацией среды обитания в кайнозой (Tamura et al., 2004). Предположительно, эксплуатация дрозофилами новых разнообразных плодов покрытосеменных способствовала их специализации и, следовательно, экологическому разнообразию группы (Russo et al., 2013). Аналогичные закономерности видообразования, по нашему мнению, прослеживаются у злаковых мух в связи с иссушением климата в конце миоцена и не столько с появлением, сколько с увеличением обилия новых потенциальных кормовых видов злаков в условиях неоднородности ландшафта.

Цикличность смен растительности во время теплых и холодных периодов климатических колебаний и сохранение популяций в рефугиумах также могли быть триггером для перехода меромиз на питание новым кормовым растением.

Смена растения-хозяина была важна для видообразования некоторых двукрылых из Tephritidae: *Eurosta solidagines* Fitch, 1855 (Craig et al., 1993; Stireman et al., 2005) и *Rhagoletis pomonella* Walsh,

1867 (Forbes et al., 2005). В кластере *variegata* *M. bohémica* отошел от *M. rufa* не ранее 250 тыс. л. н. (Triseleva et al., 2021). *M. bohémica* использует злаки из подсемейства Loliinae, а *M. rufa* – из Aveninae и Poinae. Время возникновения злака *Lolium perenne* десятикратно превышает время возникновения наиболее молодого вида кластера – *M. bohémica*. Можно предположить более раннее происхождение вида *M. rufa* в эволюционной линии *M. femorata*–*M. rufa*–*M. bohémica* из-за более раннего формирования рода тонконога *Koeleria* sp. – около 7 млн лет, в отличие от райграса пастбищного *Lolium perenne* – 2.5 млн лет. Недавно разошедшиеся виды *M. laeta* и *M. variegata* питаются разными видами злаков из рода *Festuca* и группы *Avena*-типа. Кормовые злаки для *M. femorata* частично совпадают с таковыми для *M. variegata*, *M. laeta*, *M. mosquensis*, но не включают растения надтрибы Triticeae. Развитие на эволюционно более древних и изменчивых видах злаков предполагает наличие у злаковых мух комплекса морфологических, физиологических, поведенческих и других признаков, близких к признакам предкового вида кластера – широкого олигофага.

Этому критерию соответствуют два вида-олигофага: *M. variegata* и *M. mosquensis* (Triseleva et al., 2021).

Анализ эволюции меромиз не позволяет точно указать, какому варианту видообразования фитофага (Forbes et al., 2017) соответствует эволюция группы. Однако ясно, что именно неоднородность территории способствовала симпатрическому, или экологическому, видообразованию меромиз. Поскольку источником степной флоры были луга, приуроченные к лесостепи, такие станции по составу кормовых злаков могли быть местом возникновения предковых форм меромиз.

Взаимодействия между насекомыми и их растением-хозяином в конечном счете опосредуются защитой растений-хозяев и способностью обходить эту защиту (Викторов, 2017), а также сигналами растений-хозяев и умением фитофагов обнаруживать эти сигналы (Jousselin, Elias, 2019).

Кормовые растения меромиз отличаются по ряду экологических особенностей. *M. rufa* питается на плотнокустовом виде злаков. *M. laeta* питается на низовом типе злака, а *M. variegata* — на злаках верхового и полуверхового типов. Верховые травы, в том числе *Elytrigia repens*, в отличие от низовых, характеризуются большой высотой побегов, крупными и грубыми стеблями и листьями, малой кустистостью. В целом экологические особенности злаков мало влияют на приоритеты питания злаковыми мухами, что свидетельствует о большей зависимости меромиз от зональных климатических факторов. Большой ксерофильностью обладают *M. variegata* и *M. mosquensis*, что также косвенно характеризует экологические условия обитания предковых видов меромиз.

Оценка скорости эволюции гена *COI* мтДНК показала, что расхождение трав произошло до видообразования злаковых мух *Meromyza*. Распространение, увеличение разнообразия, переход к узкой олигофагии данной группы двукрылых шли вслед за увеличением обилия потенциальных кормовых злаков. Более того, основной период формирования видового разнообразия меромиз (от конца миоцена до середины плейстоцена) имеет тенденцию к запаздыванию по отношению к моменту интенсивного формирования разнообразия злаков Triticodae и Poodeae и приходится на время, когда открытые травяные биомы с доминированием данной группы злаков уже были широко распространены.

Таким образом, можно предположить связь древности происхождения растений, их видового разнообразия и распространения в фитоценозах с формированием исходного комплекса видов злаковых мух. При изменении климатических и экологических условий, дивергенция злаковых мух происходила при переходе на питание эволюционно более молодыми злаками при расширении их ареалов, то есть при увеличении их доступности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный сценарий эволюции растения-хозяина и группы близкородственных видов меромиз согласуется с данными, полученными для других насекомых-фитофагов. Диверсификация насекомых должна отставать от диверсификации их растений-хозяев, что называется последовательной эволюцией (Jermu, 1976), или отслеживанием хозяина. Последовательное видообразование насекомых происходит с учетом уже диверсифицированной линии растений (Janz, 2011; Suchan, Alvarez, 2015).

Таким образом, возникновение степных ландшафтов началось не раньше палеоцена, хотя основные компоненты растительности степной зоны — злаки — возникли уже в раннем мелу. В высоких широтах доминируют злакиклады ВЕР, преимущественно с СЗ-типом фотосинтеза, максимально используемые меромизами в качестве кормовых. Неоднородность ландшафта и формирование рефугиумов — один из ключевых факторов диверсификации как растительности, так и связанных с ней животных. У близкородственных видов злаковых мух рода *Meromyza*, входящих в кластер *variegata*, диверсификация шла последовательной эволюцией (отслеживанием хозяина) вслед за распространением и увеличением обилия потенциальных кормовых видов злаков от полифага к олиго- и монофагам. Следовательно, из гипотез, описывающих процессы видообразования у насекомых-фитофагов, их эволюции наиболее соответствует гипотеза видообразования, названная гипотезой колебаний (the oscillation hypothesis).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Авдеев В.И. Этапы формирования степных ландшафтов в Евразии. 1. Общие аспекты проблемы // Изв. Оренбург. гос. аграрн. ун-та. 2008. Т. 2. № 18. С. 38–42.
- Авдеев В.И. Этапы формирования степных ландшафтов в Евразии. Геофлорогенетические аспекты // Изв. Оренбург. гос. аграрн. ун-та. 2009. Т. 1. № 21. С. 252–256.
- Багачанова А.К., Нарчук Э.П. Двукрылые насекомые (Diptera) как индикаторы динамичности экосистем луговых аласов Центральной Якутии // Энто-мол. обозр. 2003. Т. 82. № 2. С. 300–309.

- Бешовски В.* Рецентный ареал на род *Meromyza* Mg. (Diptera, Chloropidae) и неговото историко-географско значение // Acta Zool. Bulgar. 1986. V. 32. P. 11–18.
- Быков Б.А.* Очерки истории растительного мира Казахстана и Средней Азии. Алма-Ата: Наука, 1979. 108 с.
- Величко А.А.* Общие особенности изменений ландшафтов и климата Северной Евразии в кайнозое // Изменение климата и ландшафтов за последние 65 миллионов лет (кайнозой: от палеоцена до голоцена) / Ред. А.А. Величко, В.П. Нечаев. М.: ГЕОС, 1999. С. 219–233.
- Викторов А.Г.* Эколого-физиологические особенности Вт-растений, приводящие к вспышкам численности вторичных вредителей // Физиол. раст. 2017. Т. 64. № 4. С. 243–250.
- Грошева О.А.* Эволюционное развитие черноземов и степей Евразии в исторической ретроспективе // Междунар. журн. прикл. фонд. иссл. 2020. № 12. С. 31–35.
- Лавренко Е.М., Карамышева З.В., Никулина Р.И.* Степи Евразии / Ред. Е.М. Лавренко. Л.: Наука, 1991. 146 с.
- Нарчук Э.П.* Фитофагия у злаковых мух (Diptera, Chloropidae) и пути ее развития // Чтения памяти Н.А. Холодковского / Ред. Г.Я. Бей-Биенко. Л.: Наука, 1970. С. 3–49.
- Нарчук Э.П.* Злаковые мухи (Diptera: Chloropidae), их система, эволюция и связи с растениями / Тр. ЗИН АН СССР. Т. 136. Л.: Наука, 1987. 280 с.
- Нарчук Э.П., Федосеева Л.И.* Обзор злаковых мух рода *Meromyza* Meigen, 1830 (Diptera, Chloropidae) фауны Палеарктики с определительной таблицей, анализом синонимии, пищевой специализации и географического распространения. Ч. 2 // Энтомолог. обозр. 2011. Т. 90. № 2. С. 442–463.
- Пономаренко А.Г.* Зооиндикация эволюции травяных биомов // Палеопочвы и индикаторы континентального выветривания в истории биосферы / Ред. С.В. Рожнов, В.А. Демкин. М.: ПИН РАН, 2010. С. 120–131.
- Проханов Я.И.* Травянистые равнины и новейшие пустыни, их природа и происхождение // Проблемы филогении растений. Труды МОИП. Отдел биологический. Секция ботаники. Т. 13 / Ред. А.В. Благовещенский. М.: Наука, 1965. С. 124–154.
- Родендорф Б.Б.* Отряд Muscida Laicharting, 1781. Двукрылые // Историческое развитие класса насекомых / Тр. Палеонтологического ин-та. Т. 178 / Ред. Б.Б. Родендорф, А.П. Расницын. М.: Наука, 1980. С. 112–122.
- Сафонкин А.Ф., Триселева Т.А., Яцук А.А., Акентьева Н.А.* Эволюция постгонитов у злаковых мух рода *Meromyza* (Diptera, Chloropidae) // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 11. С. 1334–1342.
- Сафонкин А.Ф., Горюнова С.В., Горюнов Д.В., Триселева Т.А.* Злаковые мухи рода *Meromyza* (Diptera, Chloropidae) и злаки (Poaceae): эволюция пищевых приоритетов // Экол. генет. 2020. Т. 18. № 4. С. 433–444.
<https://doi.org/10.17816/ecogen42539>
- Ткаченко В.С.* Фитоценотический мониторинг резервных сукцесий в Украинському степовому природному заповіднику. Київ: Фітосоціоцентр, 2004. 184 с.
- Федосеева Л.И.* Определитель злаковых мух рода *Meromyza* Meigen, 1830 (Diptera, Chloropidae) фауны России и сопредельных стран // Евразийск. энтомолог. журн. 2003. Т. 2. № 2. С. 145–154.
- Цвелев Н.Н.* Система злаков (Poaceae) и их эволюция. Л.: Наука, 1987. 73 с.
- Чибилев А.А.* Экологическая оптимизация степных ландшафтов. Свердловск: УрО АН СССР, 1992. 172 с.
- Becerra J.X., Venable D.L.* Macroevolution of insect-plant associations: the relevance of host biogeography to host affiliation // PNAS USA. 1999. V. 96. P. 12626–12631.
- Brower A.V.Z.* Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution // PNAS USA. 1994. V. 91. P. 6491–6495.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6491>
- Bruzzese D.J., Wagner D.L., Harrison T. et al.* Phylogeny, host use, and diversification in the moth family Momphidae (Lepidoptera: Gelechioidea) // PLoS One. 2019. V. 14. № 6. P. e0207833.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207833>
- Christin P.-A., Besnard G., Samaritani E. et al.* Oligocene CO₂ decline promoted C4 photosynthesis in grasses // Curr. Biol. 2008. V. 18. № 1. P. 37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.058>
- Craig T.P., Itami J.K., Abrahamson W.G., Horner J.D.* Behavioral evidence for host race formation in *Eurosta solidagines* // Evolution. 1993. V. 47. № 6. P. 1696–1710.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb01262.x>
- Drès M., Mallet J.* Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. 2002. V. 357. № 1420. P. 471–492.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1059>
- Elias M., Faria R., Gompert Z., Hendry A.* Factors influencing progress toward ecological speciation // Int. J. Ecol. 2012. V. 2012. № 6. Art. 235010.
<https://doi.org/10.1155/2012/235010>
- Forbes A.A., Fisher J., Feder J.L.* Habitat avoidance: overlooking an important aspect of host-specific mating and sympatric speciation? // Evolution. 2005. V. 59. № 7. P. 1552–1559.
<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01804.x>
- Forbes A.A., Devin S.N., Hippee A.C. et al.* Revisiting the particular role of host shifts in initiating insect speciation // Evolution. 2017. V. 71. № 5. P. 1126–1137.
<https://doi.org/10.1111/evo.13164>
- Funk D.J., Filchak K.E., Feder J.L.* Herbivorous insects: model systems for the comparative study of speciation ecology // Genetica. 2002. V. 116. № 2–3. P. 251–267.
https://doi.org/10.1007/978-94-010-0265-3_10
- Gaujour E., Amiaud B., Mignolet C., Plantureux C.* Factors and processes affecting plant biodiversity in permanent grasslands. A review // Agron. Sustain. Dev. 2012. V. 32. № 1. P. 133–160.
<https://doi.org/10.1007/s13593-011-0015-3>
- Gibson D.J.* Grasses and grassland ecology. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2009. 305 p.
- Hewitt G.M.* Molecular genetics in animal ecology // Biol. J. Linn. Soc. 1999. V. 68. P. 87–112.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01160.x>
- Homburg K., Drees C., Gossner M.M. et al.* Multiple glacial refugia of the low-dispersal ground beetle *Carabus ir-*

- regularis*: molecular data support predictions of species distribution models // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. P. e61185.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061185
- Hurka H., Friesen N., Bernhardt K.-G. et al. The Eurasian steppe belt: *status quo*, origin and evolutionary history // Turczaninowia. 2019. V. 22. № 3. P. 5–71.
- Hylander K., Ehrlén J., Luoto M., Meineri E. Microrefugia: not for everyone // Ambio. 2015. V. 44. P. S60–S68.
https://doi.org/10.1007/s13280-014-0599-3
- Jamnongluk W., Baimai V., Kittayapong P. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial *COI* sequences // Genome. 2003. V. 19. P. 19–25.
https://doi.org/10.1023/A:1024481032579
- Janz N. Ehrlich and Raven revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies // Annu. Rev. Ecol. 2011. V. 42. P. 71–89.
https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145024
- Janz N., Nylin S. The oscillation hypothesis of host-plant range and speciation // The evolutionary biology of herbivorous insects: specialization, speciation and radiation / Ed. K.J. Tilman. CA: Univ. California Press, 2008. P. 203–215.
https://doi.org/10.1525/california/9780520251328.003.0015
- Jermy T. Insect–host-plant relationship – co-evolution or sequential evolution? // The host-plant in relation to insect behaviour and reproduction / Ed. T. Jermy. N.Y.: Springer, 1976. P. 109–113.
- Jousselin E., Elias M. Testing host-plant driven speciation in phytophagous insects: a phylogenetic perspective // BioArXiv. 2019.
https://doi.org/10.20944/preprints201902.0215.v1
- Kellogg E.A. Flowering plants. Monocots, Poaceae // The families and genera of vascular plants. V. 13 / Ed. K. Kubitzki. Heidelberg: Springer, 2015. P. 725.
- Kergoat G.J., Condamine F.L., Toussaint E.F.A. et al. Opposite macroevolutionary responses to environmental changes in grasses and insects during the Neogene grassland expansion // Nat. Commun. 2018. V. 9. P. 5089.
https://doi.org/10.1038/s41467-018-07537-8
- Kovar-Eder J., Jechorek H., Kvaček Z., Parashiv V. The integrated plant record: an essential tool for reconstructing Neogene zonal vegetation in Europe // Palaios. 2008. V. 23. P. 97–111.
- Matsubayashi K.W., Ohshima I., Nosil P. Ecological speciation in phytophagous insects // Entomol. Exp. Appl. 2010. V. 134. № 1. P. 1–27.
https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00916.x
- Nosil P. Ecological speciation. Oxford: Oxford Univ. Press, 2012. 279 p.
- Nylin S., Janz N. Butterfly host plant range: an example of plasticity as a promoter of speciation? // Evol. Ecol. 2009. V. 23. № 1. P. 137–146.
- Nylin S., Slove J., Janz N. Host plant utilization, host range oscillations and diversification in nymphalid butterflies: a phylogenetic investigation // Evolution. 2014. V. 68. P. 105–124.
- Nyman T., Vikberg V., Smith D.R., Boeve J.L. How common is ecological speciation in plant-feeding insects? A “Higher” Nematinae perspective // BMC Evol. Biol. 2010. V. 10. № 1. P. 266.
https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-266
- Nyman T., Linder H.P., Pena C. et al. Climate-driven diversity dynamics in plants and plant-feeding insects // Ecol. Lett. 2012. V. 15. P. 889–898.
- Papadopoulou A., Anastasiou I., Vogler A.P. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the Mid-Aegean trench calibration // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. № 7. P. 1659–1672.
https://doi.org/10.1093/molbev/msq051
- Parmesan C. Ecological and evolutionary responses to recent climate change // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2006. V. 37. P. 637–669.
https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110100
- Pimentel M., Escudero M., Sahuquillo E. et al. Are diversification rates and chromosome evolution in the temperate grasses (Pooideae) associated with major environmental changes in the Oligocene-Miocene? // PeerJ. 2017. V. 5. P. e3815.
https://doi.org/10.7717/peerj.3815
- Pitteloud C., Arrigo N., Suchan T. et al. Climatic niche evolution is faster in sympatric than allopatric lineages of the butterfly genus *Pyrgus* // Proc. Biol. Sci. 2017. V. 284. № 1852. P. 20170208.
https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0208
- Rowan R.G., Hunt J.A. Rates of DNA change and phylogeny from the DNA sequences of the alcohol dehydrogenase gene for five closely related species of Hawaiian *Drosophila* // Mol. Biol. Evol. 1991. V. 8. № 1. P. 49–70.
https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040636
- Rundle H.D., Nosil P. Ecological speciation // Ecol. Lett. 2005. V. 8. P. 336–352.
https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x
- Russo C., Mello B., Frazão A., Voloch C. Phylogenetic analysis and a time tree for a large drosophilid data set (Diptera: Drosophilidae) // Zool. J. Linn. Soc. 2013. V. 169. № 4. P. 765–775.
https://doi.org/10.1111/zoj.12062
- Safonkin A.F., Yatsuk A.A., Triseleva T.A. Variability of the key features and revision of a group of closely related species of grassflies (Diptera, Chloropidae, *Meromyza*) // ZooKeys. 2020. V. 942. P. 65–75.
https://doi.org/10.3897/zookeys.942.49644
- Sahoo R.K., Warren A.D., Collins S.C., Kodandaramaiah U. Hostplant change and paleoclimatic events explain diversification shifts in skipper butterflies (family: Hesperiidae) // BMC Evol. Biol. 2017. V. 17. № 1. P. 174.
https://doi.org/10.1186/s12862-017-1016-x
- Schluter D. Ecological causes of speciation // Endless forms: species and speciation / Eds D.J. Howard, S.H. Berlocher. Oxford: Oxford Univ. Press, 1998. P. 114–129.
- Schluter D. Evidence for ecological speciation and its alternative // Science. 2009. V. 323. № 5915. P. 737–741.
https://doi.org/10.1126/science.1160006
- Slove J., Janz N. The relationship between diet breadth and geographic range size in the butterfly subfamily Nymphalinae – a study of global scale // PLoS One. 2011. V. 6. № 1. P. e16057.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016057
- Spriggs E.L., Christin P.-A., Edwards E.J. C4 photosynthesis promoted species diversification during the Miocene grassland expansion // PLoS One. 2014. V. 9. № 5.

- P. e97722.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097722>
- Stireman J., Nason J., Heard S.* Host associated genetic differentiation in phytophagous insects: general phenomenon or isolated exceptions? Evidence from a goldenrod-insect community // *Evolution*. 2005. V. 59. № 12. P. 2573–2587.
<https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb00970.x>
- Strömberg C.A.E.* Decoupled taxonomic radiation and ecological expansion of open-habitat grasses in the Cenozoic of North America // *PNAS USA*. 2005. V. 102. P. 11980–11984.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505700102>
- Strömberg C.A.E.* Evolution of grasses and grassland ecosystems // *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2011. V. 39. P. 517–544.
<https://doi.org/10.1146/annurev-earth-040809-152402>
- Suchan T., Alvarez N.* Fifty years after Ehrlich and Raven, is there support for plant-insect coevolution as a major driver of species diversification? // *Entomol. Exp. Appl.* 2015. V. 157. P. 98–112.
- Tamura K., Subramanian S., Kumar S.* Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. № 1. P. 36–44.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msg236>
- Thomas J.A., Welch J.J., Lanfear R., Bromham L.* A generation time effect on the rate of molecular evolution in invertebrates // *Mol. Biol. Evol.* 2010. V. 27. № 5. P. 1173–1180.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msq009>
- Triseleva T.A., Petrosyan V.G., Yatsuk A.A., Safonkin A.F.* The role of plants in the formation of species-specific features in grass flies (Diptera, Chloropidae, *Meromyza*) // *Biodiv. Data J.* 2021. V. 9. P. e78017.
<https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e78017>
- Vicentini A., Barber J.C., Aliscioni S.S. et al.* The age of the grasses and clusters of origins of C4 photosynthesis // *Glob. Change Biol.* 2008. V. 14. P. 2963–2977.
- Walter H.* Die Vegetation der Erde in öko-physiologischer Betrachtung. Band II. Die gemäßigten und arktischen Zonen. Stuttgart: G. Fischer, 1968. 1001 S.
- Walter H.* Die Vegetation Osteuropas, Nord- und Zentralasiens. Stuttgart: G. Fischer, 1974. 452 S.
- Winkler I.S., Mitter C.* The phylogenetic dimension of insect/plant interactions: a review of recent evidence // *The evolutionary biology of herbivorous insects: specialization, speciation and radiation* / Ed. K.J. Tilman. CA: Univ. California Press, 2008. P. 240–263.

The Role of Grass Biomes in Diversification of Phytophagous Insects

A. F. Safonkin^{a, *}, T. A. Triseleva^a, and A. A. Yatsuk^a

^a*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**e-mail: andrej-safonkin@yandex.ru*

Based on literature, the evolution of the steppe zone of Eurasia and the evolution patterns of grasses dominating in the steppe biocenoses were characterized. The hypothesis that the grasses divergence preceded the beginning of their dominance in the Neogene has been discussed. The factors promoting the origin of phytophagous insects were discussed. Hypotheses explaining the speciation of phytophagous insects were presented. The higher Diptera, Chloropidae, including grass flies of the genus *Meromyza* Mg., the dominant species of grass ecosystems, were characterized. The origin time of *Meromyza* using the mtDNA *COI* gene locus was estimated in comparison with *Drosophila*, for which the time of speciation was known. The time of divergence of host plants was compared with evolution of *Meromyza* flies. We described the strategy of feeding specialization in evolution of *Meromyza* flies for the closely related European species of the “variegata” cluster. It was shown that distribution, diversification, the change of polyphagy- for oligo- and monophagy followed the increase in the abundance of potential host plants, which corresponds to the hypothesis of speciation, known as “the oscillation hypothesis”.

Keywords: steppe biocenosis, insect-plant coevolution, Diptera, phytophagous

УДК 576.54

ФОРМИРОВАНИЕ АГРЕГАТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ: РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК

© 2022 г. Е. И. Григорьева^{1, 2, *}, Ю. В. Сидорчук¹, Е. В. Дейнеко¹¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: grigoreva.eln@mail.ru

Поступила в редакцию 28.04.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Использование культур клеток высших растений для наработки рекомбинантных белков, в том числе медицинского назначения, представляется перспективной альтернативой существующим платформам на основе клеток млекопитающих или бактерий. Несомненные преимущества растительных клеток: полное отсутствие риска контаминации вирусами и прионами животного происхождения; достаточно высокая скорость роста клеток; относительно низкая стоимость компонентов питательных сред; возможность обеспечения производства рекомбинантных белков в строго контролируемых условиях биореакторов в соответствии с нормами Надлежащей производственной практики – GMP (Good Manufacturing Practice). Несмотря на то, что растительные клетки уже используются в промышленных масштабах для наработки биофармацевтиков, в этом направлении остается еще много нерешенных проблем. Наиболее важными из них являются все еще низкий уровень выхода рекомбинантного белка, а также способность растительных клеток к образованию агрегатов при культивировании *in vitro*. Образование клеточных агрегатов, различающихся по величине, представляет серьезную проблему при культивировании суспензионных культур, в особенности в больших объемах промышленных биореакторов. В основе образования агрегатов в суспензионных клеточных культурах лежит природная способность клеток растений к адгезии – после завершения деления клетки остаются связанными между собой посредством формирования общих срединных пластинок. В предлагаемом обзоре описаны особенности структуры растительной клетки, биохимические механизмы, лежащие в основе адгезии, а также их генетическая основа. Рассмотрены перспективы применения современных методов геномного редактирования для изменения функционирования генов, принимающих участие в обеспечении межклеточной адгезии растительных клеток.

Ключевые слова: суспензионные культуры клеток растений, клеточные агрегаты, межклеточная адгезия, *Arabidopsis thaliana*, гены семейства *GAUT*

DOI: 10.31857/S0042132422060035

ВВЕДЕНИЕ

Суспензионные клеточные культуры – перспективная платформа для наработки рекомбинантных белков фармацевтического назначения (Загорская, Дейнеко, 2017). В отличие от целых растений, они характеризуются более быстрым накоплением биомассы и способностью секретировать биологически активные белки в межклеточное пространство, что значительно упрощает работу с ними (Firek et al., 1993). Кроме того, при культивировании в биореакторах всегда строго контролируются стерильные условия, что снижает риск контаминации клеточных культур растений (Kolewe et al., 2008). Суспензии клеток растений в качестве платформы для наработки рекомбинантных белков имеют ряд преимуществ относительно платформ

на основе бактериальных культур и клеток животных. Поддержание культур клеток растений характеризуется простотой и более низкой стоимостью, по сравнению с клетками животных. В культурах клеток растений происходит корректный фолдинг рекомбинантных белков и их посттрансляционные модификации, что представляется чрезвычайно важным при сопоставлении с бактериальными системами экспрессии.

Несмотря на привлекательность клеточных культур высших растений в качестве альтернативных систем экспрессии для наработки рекомбинантных белков, а также использование этой платформы для наработки некоторых биофармацевтиков в промышленных масштабах (Загорская, Дейнеко, 2017), в этом направлении все еще оста-

ются нерешенные проблемы. Наиболее важные из них: недостаточно высокий выход рекомбинантного белка, а также способность клеток растений к образованию агрегатов. Следует подчеркнуть, что обе эти проблемы представляются, на наш взгляд, взаимосвязанными, и решение одной из них (уменьшение размеров клеточных агрегатов) может привести к возрастанию синтетических способностей клеточной культуры.

В процессе деления клетки растений, культивируемые *in vitro* в жидких питательных средах, не переходят в культуральную среду в виде одиночных клеток, а проявляют тенденцию к сохранению связей между собой, образуя группы клеток разного размера. Таким образом, клеточные агрегаты — это группы клеток, которые остаются связанными между собой после их деления в суспензионной культуре. В структуре агрегатов, которые могут содержать в себе до нескольких сотен клеток, часто наблюдается гетерогенность, так как разные клетки в составе агрегата имеют разный доступ к компонентам питательной среды (Zhao et al., 2003). Клетки в центре агрегата не получают достаточного количества питательных веществ и кислорода из среды, а клетки, находящиеся на поверхности агрегата, часто повреждаются при перемешивании в процессе культивирования, за счет чего отмирают раньше, чем оставшаяся масса агрегата. Все это приводит к различию метаболизма клеток в разных частях агрегата (Patil, Roberts, 2013). Преодоление именно этого явления и лежит в основе усилий по повышению синтетического потенциала клеточных культур за счет снижения их способности к образованию крупных клеточных агрегатов.

В ряде экспериментов установлено, что снижение агрегированности суспензий приводит к повышению выхода вторичных метаболитов. Так, например, клеточные культуры *Taxus* с мелкими агрегатами накапливали в 2–20 раз больше паклитаксела, чем культуры с более крупными агрегатами (Kolewe et al., 2011; Patil et al., 2013). Для клеточных культур *Tagetes patula*, используемых для получения тиофена (Hulst et al., 1989), отмечается, что уменьшение размеров агрегатов в определенном диапазоне также приводило к повышению выхода целевого метаболита. Однако на примере клеточной культуры *Saussurea medusa* показано, что снижение агрегированности не всегда приводит к увеличению выхода вторичных метаболитов — изменение размера агрегатов значимо не влияет на выход яцеозидина и гиспидулина (Zhao et al., 2003). Эти данные свидетельствуют о том, что, вероятно, для каждой культуры характерен свой диапазон размера агрегатов, оптимальный для продукции вторичных метаболитов.

На образование агрегатов в суспензионной культуре могут влиять различные факторы. В их числе

состав питательной среды. На агрегацию клеток влияет наличие регуляторов роста в среде. Высокие уровни 2,4-дихлорфенолуксусной кислоты обычно приводят к мелкодисперсным культурам с лучшим разделением клеток, низкие уровни — увеличивают агрегацию клеток (Liau, Boll, 1971; George et al., 2008). Использование в среде α -нафтилуксусной кислоты в качестве ауксина приводит к значительному увеличению размера агрегатов (Смоленская и др., 2007). Более высокие уровни цитокининов часто вызывают большую агрегацию (Kinnersley, Dougall, 1980). Кроме того, pH среды, частота пересева и скорость перемешивания также могут повлиять на распределение размеров агрегатов (Henshaw et al., 1966; Steiner, Dougall, 1995; Kieran et al., 2000).

Помимо оптимизации состава среды и условий культивирования, существуют и другие возможности целенаправленного снижения агрегированности суспензионных культур. Среди них есть как химические и ферментативные, так и механические способы. К химическим способам относятся: обработка ферментами, деградирующими клеточную стенку (Naill, Roberts, 2004); добавление гормонов (Diwan, Malpathak, 2010), колхицина (Hayashi, Yoshida, 1988), метаболических ингибиторов, например L- α -аминоокси- β -фенилпропаноидной кислоты (Edahiro, Seki, 2006); снижение концентрации Ca^{2+} (Takayama et al., 1977). Среди физических способов: фильтрация суспензий через фильтры с порами разного диаметра (Henshaw et al., 1966); подача импульсов сжатого воздуха (Kurz, 1971); селективное извлечение агрегатов крупного размера или иммобилизация клеток (Prenosil, Hegglin, 1990).

Широкое разнообразие методов снижения агрегированности обусловлено тем, что каждый из них имеет существенные недостатки. Химические и ферментативные методы могут влиять на экспрессию генов, что может привести к изменению метаболических свойств клеточной культуры. В отдельных случаях высокие концентрации некоторых агентов могут негативно сказаться на ростовых характеристиках культур. Механические методы требуют постоянного повторения, поскольку эффект каждого из них является временным (Patil, Roberts, 2013). По этой причине ни один из вышеперечисленных методов не универсален.

В основе образования агрегатов лежит характерное для растений явление межклеточной адгезии, поддерживающей связь между дочерними клетками после их разделения. Адгезия обеспечивается полисахаридами клеточной стенки, из которых наибольший вклад в поддержание межклеточных контактов вносят пектины (Daher, Braybrook, 2015). Синтез пектинов и их модификация — многостадийный процесс, вовлекающий большое количество ферментов, для части кото-

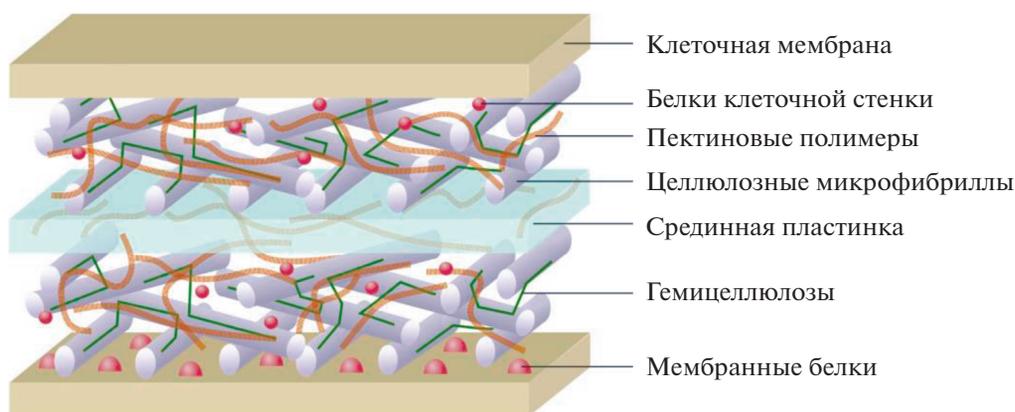


Рис. 1. Схема строения первичной клеточной стенки.

рых до сих пор все еще не установлена четкая биохимическая функция. Данный обзор нацелен на анализ имеющихся современных данных об особенностях структуры клеточной стенки растений, о роли механизмов, лежащих в основе адгезии клеток, и генов, контролирующих реализацию этих механизмов. Имеющиеся в настоящее время методы и подходы геномного редактирования позволяют рассчитывать на получение нокаутов некоторых ключевых генов, контролирующих важные биохимические реакции, связанные с процессами адгезионных взаимодействий клеток. Выключение некоторых звеньев, обеспечивающих адгезионные взаимодействия между клетками, дает основание надеяться на их ослабление и, как результат этого, на снижение размеров клеточных агрегатов в суспензионных культурах клеток растений.

СТРУКТУРА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТЕНИЙ

Межклеточная адгезия имеет существенное значение для формирования и поддержания структуры растения в целом, обеспечивая множество процессов, происходящих на протяжении всей жизни растения. Адгезионные связи между клетками реализуются за счет полимеров клеточных стенок посредством их модификаций и взаимодействий друг с другом.

Клеточные стенки – сложные и динамичные структуры (Горшкова, 2007). Они разнообразны по своему строению и функциям, их химический состав и структура могут изменяться в зависимости от типа клеток, стадии развития и вида растений (McCann, Knox, 2010). Выделяют три группы клеточных стенок. Первичные клеточные стенки, имеющиеся у всех клеток растений, образуются в процессе активного роста клеток и состоят по большей части из полисахаридов. Вторичные клеточные стенки, которые встречаются в дифференци-

рованных клетках, содержат преимущественно полисахариды и лигнин. Кроме того, у некоторых видов растений можно встретить желатинозный слой, который состоит почти полностью из полисахаридов (Anderson, Kieber, 2020).

Первичная клеточная стенка имеется у всех растений и состоит из большого количества компонентов (рис. 1). У двудольных, в частности и у *Arabidopsis thaliana*, она состоит из сети целлюлозных микрофибрилл, которые переплетаются и соединяются при помощи разветвленных полисахаридов – пектинов и гемицеллюлоз (Lampugnani et al., 2018). Помимо полисахаридов, клеточная стенка содержит структурные белки и ферменты (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007).

Полисахариды, входящие в состав клеточных стенок, разнообразны по строению и варьируют от линейных полимеров до сложных, разветвленных молекул (Anderson, Kieber, 2020). Целлюлоза – основной структурный компонент всех клеточных стенок, она обеспечивает прочность клеток и определяет их форму. Цепи β -1,4-глюканов соединяются водородными связями и формируют целлюлозные микрофибриллы (Anderson, Kieber, 2020). Каллоза – полимер, состоящий из глюкозных звеньев, соединенных β -1,3-связями, синтезируется только на определенных стадиях развития в некоторых клеточных структурах, например в срединной пластинке и плазмодесмах. Молекулы каллозы часто разрушаются вскоре после синтеза, что делает ее одним из самых динамичных компонентов клеточной стенки (Ellinger, Voigt, 2014). Синтез целлюлозы и каллозы осуществляется непосредственно на цитоплазматической мембране клетки (Haigler, 2018; Zhang et al., 2021).

Следующий важный компонент клеточной стенки растений – гемицеллюлозы. Основная функция гемицеллюлоз в первичной клеточной стенке – это сшивание соседних микрофибрилл целлюлозы с образованием трехмерной структуры, способной противостоять тургорному давлению.

нию клетки (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Гемицеллюлозы представлены ксилоглюканами, ксиланами, маннанами и глюканами со смешанными связями (Scheller, Ulvskov, 2010). Самый часто встречаемый в первичных клеточных стенках полисахарид из группы гемицеллюлоз — ксилоглюкан. Остатки глюкозы в скелете ксилоглюканов соединены β -1,4-связями, а боковые цепи, содержащие остатки ксилозы, галактозы и фукозы, соединены разными видами связей. Ксиланы имеют скелет, состоящий из β -1,4-связанных ксилозильных остатков с боковыми цепями, содержащими в основном арабинозу и глюкуроновую кислоту (Anderson, Kieber, 2020). Маннаны имеют скелет из остатков маннозы, связанных также β -1,4-связями. Глюкоманнаны содержат в остове как глюкозу, так и маннозу. В активно растущих тканях однодольных растений порядка Commelinales часто встречаются глюканы, которые в своем скелете содержат β -1,4- и β -1,3-связи (Scheller, Ulvskov, 2010).

Большую долю среди полисахаридов первичной клеточной стенки составляют пектины, в среднем — одну треть от всех полисахаридов, входящих в структуру клеточных стенок. Они входят в состав матричной части клеточной стенки и принимают участие в формировании сайтов адгезии клеток (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Отличительная черта пектинов — остов, содержащий галактуроновую кислоту. Пектины представлены тремя классами: гомогалактуронаны, рамногалактуронаны I и рамногалактуронаны II (Daher, Braybrook, 2015). Гомогалактуронаны — наиболее распространенный класс пектинов, их скелет состоит из остатков галактуроновой кислоты, соединенных α -1,4-связями. Иногда они могут иметь ответвления из ксилозных и апиозных цепей (Mohnen, 2008). Гомогалактуронаны могут быть метилэтерифицированы по C6 карбоксильной группе остатка галактуроновой кислоты или ацетилированы по позициям O2 и O3 (Mohnen, 2008). Остов рамногалактуронанов I состоит из чередующихся остатков галактуроновой кислоты и рамнозы, и к нему присоединены боковые цепи из арабинана, галактана и арабиногалактана. Рамногалактуронаны II — это высококонсервативный и сложный класс пектинов, полимеры этого класса имеют основной скелет, как у гомогалактуронанов, дополненный боковыми цепями, содержащими до 13 различных сахаров и более 20 различных гликозильных связей (Anderson, Kieber, 2020).

Помимо полисахаридов, клеточные стенки в своем составе имеют белковые компоненты. Сложные паттерны гликозилирования этих белков и большие семейства генов затрудняют их функциональную характеристику (Borassi et al., 2016). Структурные белки клеточной стенки включают экстенсины, которые представляют собой гликопротеины, богатые гидроксипролином, белки, богатые пролином, и арабиногалактановые белки.

Помимо структурных белков, в клеточной стенке имеются и белки, несущие ферментативные функции. Кроме полимерных компонентов, клеточные стенки содержат ионы, малые метаболиты и воду в двух формах — свободную и связанную (Anderson, Kieber, 2020).

Клеточная стенка — это не простая сумма компонентов. Взаимодействия между отдельными составляющими и возможность регулирования этих взаимодействий являются определяющими как для механических, так и для других характеристик клеточных стенок (Gu, Rasmussen, 2022). Поэтому для определения механических характеристик клеточных стенок решающее значение имеют взаимодействия между полимерами (Anderson, Kieber, 2020). Так, например, ксилоглюканы и ксиланы связываются с целлюлозными микрофибриллами водородными связями, образуя сеть (McCann, Knox, 2010). Ксилоглюканы могут быть ковалентно связаны с пектиновыми полимерами (Popper, Fry, 2008). Боковые цепи арабинана и галактана, связанные с пектиновым полимером RG-I (рамногалактуронан I), могут прикрепляться к микрофибриллам целлюлозы аналогично гемицеллюлозам (Zykwinska et al., 2007). Взаимодействия пектинов друг с другом и с другими полимерами — важный фактор для формирования межклеточной адгезии (Daher, Braybrook, 2015).

МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АДГЕЗИЮ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

Контакты между клетками растений устанавливаются во время их деления — между двумя дочерними клетками образуется клеточная пластинка, которая в дальнейшем будет связывать две соседние клетки. Основной полимер срединной пластинки — каллоза. Однако важным процессом, необходимым для ее формирования, также является слияние везикул, содержащих гомогалактуронан (Drakakaki, 2015). Благодаря срединной пластинке клетки остаются связанными друг с другом, из-за чего дальнейший рост и развитие соседних клеток становятся согласованными процессами (Jarvis et al., 2003).

Долгое время считалось, что срединная пластинка является основным местом соединения клеток, однако на данный момент времени исследователи считают, что больший вклад в адгезию клеток растений вносят области, формирующиеся в месте соединения трех клеток — двух дочерних и прилегающей к ним третьей клетки (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Тургорное давление, придающее тканям прочность, — основная сила, способствующая разделению клеток. Наибольшее напряжение за счет тургорного давления создается именно в углах клеток (Jarvis et al., 2003). В этой области формируется межклеточное пространство,

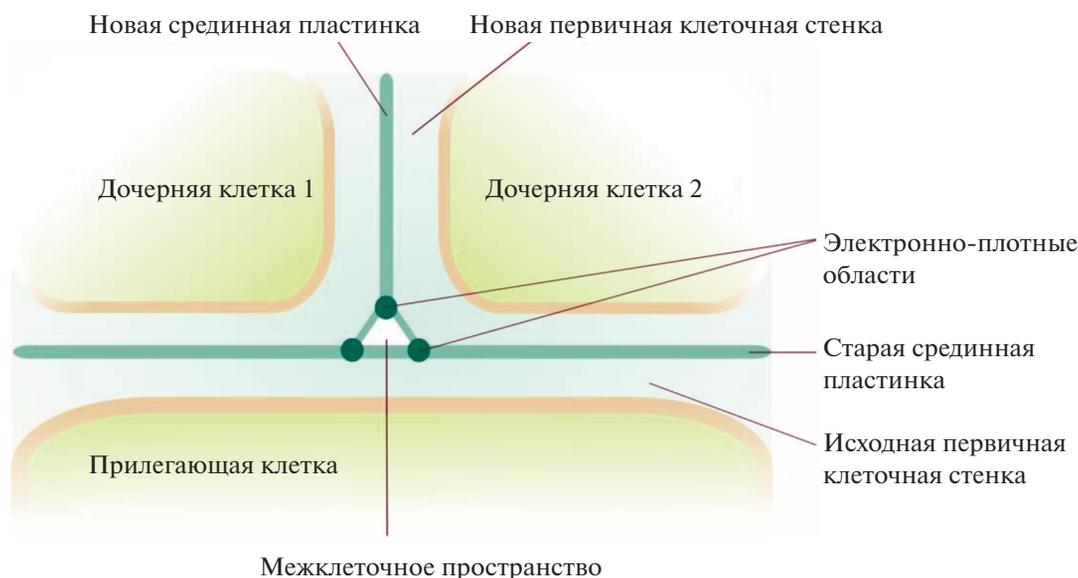


Рис. 2. Схема соединения трех клеток и формирования межклеточного пространства между ними.

которое до определенной степени расширяется вдоль срединных пластинок, а по углам этого пространства наблюдаются электронно-плотные области (рис. 2) (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). Структура стенки в этих областях имеет свои особенности — они характеризуются отличиями в строении пектинов и наборе белков (McCann, Knox, 2010).

Основные полимеры клеточной стенки, обеспечивающие адгезию, — гомогалактуронаны. Именно эта фракция пектинов наиболее широко представлена в срединной пластинке и углах клеток (Parker et al., 2001). Содержание других пектиновых фракций — рамногалактуронана I и рамногалактуронана II — выявляется на низком уровне (Jarvis et al., 2003). В зонах адгезии клеток наблюдается повышенное содержание Ca^{2+} (Nuxham et al., 1999). Пектин, доставляемый к клеточной стенке во время ее формирования, сильно этерифицирован метильными группами. Ферменты пектинметилэстеразы (pectinmethylesterases, PME) удаляют метильные группы с гомогалактуронана и делают его более доступным для взаимодействия с ионами кальция, благодаря которым формируются ионные сшивки. Сила таких ионных поперечных мостиков значительно увеличивается, когда несколько ионизированных остатков галактуроната соседствуют друг с другом на каждой из двух гомогалактуронановых цепей (Micheli, 2001). Эти ионные сшивки влияют на механические свойства гомогалактуронана — делают его менее гибким, что позволяет формировать прочные структуры, удерживающие клетки связанными друг с другом (Peaucelle et al., 2011). Активность PME находится в балансе с активностью ингибиторов пектинметилэстераз (pectinmethylesterase inhibi-

tors, PME1), что позволяет поддерживать баланс между прочностью и гибкостью при формировании адгезивных сайтов (Dahe, Braybrook, 2015). Характер метилирования гомогалактуронана отличается в углах клеток и межклетниках (Manfield et al., 2005), что говорит о разной роли этих областей в поддержании межклеточной адгезии.

Адгезия клеток растений — комплексное явление, поэтому, помимо самих пектинов и их модификаций, на адгезию влияют еще и взаимодействия гомогалактуронана с другими компонентами клеточной стенки. Важным является фактор прикрепления срединной пластинки к первичной клеточной стенке. Некоторые молекулы пектина ковалентно связываются с ксилоглоканами, формируя пектин-ксилоглокановые комплексы. Эти комплексы соединяются с первичной стенкой на каждой стороне срединной пластинки за счет того, что ксилоглокановый компонент может легко связываться с целлюлозными микрофибриллами (Cumming et al., 2005).

Помимо полисахаридов, в формировании адгезивных сайтов принимают участие и специфические для срединной пластинки белки (Jarvis et al., 2003). Они могут образовывать нековалентные связи с пектинами или друг с другом. Например, арабиногалактановые белки (arabinogalactan-proteins, AGPs) связываются с пектинами посредством кальциевых сшивок (Baldwin, McCann, Roberts, 1993). AGPs — это белки, полипептидная цепь которых несет на себе большое количество полисахаридных заместителей, содержащих арабинозу и галактозу (Roberts, Gonzalez-Carranza, 2007). AGPs присутствуют вблизи клеточной стенки и через якорь гликозилфосфатидилинозитола

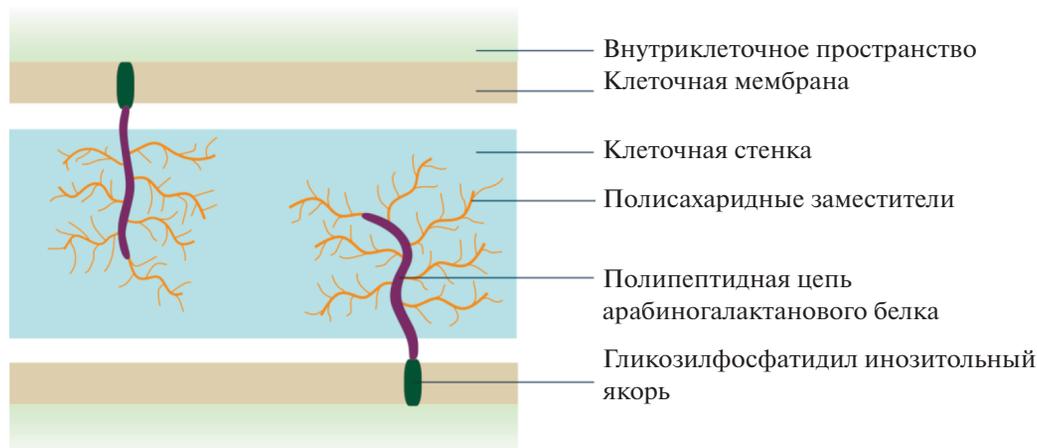


Рис. 3. Схема расположения арабиногалактановых белков в мембране и клеточной стенке растительной клетки.

(*glycosylphosphatidylinositol*, GPI) прикреплены к плазматической мембране (Lin et al., 2022). AGPs, связываясь с одной стороны с мембраной клетки, а с другой – с полисахаридами матрикса клеточной стенки, являются важным фактором в прикреплении клеточной стенки к мембране и в межклеточной адгезии (рис. 3) (Tan et al., 2013).

В силу своей сложности природа межклеточной адгезии до сих пор остается не до конца изученной, однако на сегодня известно, что в обеспечении адгезии принимает участие большое количество компонентов клеточной стенки, взаимодействующих друг с другом. Имеющиеся данные позволяют утверждать, что пектины, а именно гомогалактуронан, играют большую роль в формировании сайтов адгезии, поэтому далее будут рассмотрены особенности синтеза именно этого типа полимеров клеточной стенки.

ФЕРМЕНТЫ СИНТЕЗА И МОДИФИКАЦИИ ГОМОГАЛАКТУРОНАНА

Поскольку пектины играют важную роль в адгезии клеток, модификации их синтеза можно рассматривать как перспективный инструмент для регуляции адгезии. В биосинтезе пектинов участвует большое количество ферментов, среди которых гликозил- и метилтрансферазы (Mohnen, 2008).

Гликозилтрансферазы

Полимеризация пектинов происходит за счет присоединения к цепи полисахарида сахаров, представленных в активированной форме нуклеозиддифосфатных остатков с формированием гликозидных связей. Большая часть таких остатков синтезируется в цитозоле, а сама сборка полисахаридных цепей осуществляется во внутреннем пространстве аппарата Гольджи (Lampugnani et al., 2018). В клеточную стенку пектины доставляются

посредством экзоцитоза везикул, при участии актиновых и миозиновых компонентов цитоскелета (Mohnen, 2008).

Гликозилтрансферазы (*glycosyltransferases*, GTs) – группа ферментов, катализирующих перенос фрагментов простых сахаров от активированных донорных молекул к специфическим акцепторным молекулам с образованием гликозидных связей (Zabotina et al., 2021). В настоящий момент известно более 100 семейств GTs. Гомология внутри семейств GTs и между ними низкая, так как большинство GTs ответственно за формирование специфических связей. GTs подразделяют на два типа. Тип I включает в себя ферменты, катализирующие непрерывное добавление гликозильных остатков и обеспечивающие тем самым эффективную полимеризацию. Обычно это интегральные мембранные белки, которые синтезируют гомополисахариды. GTs типа II катализируют только один перенос, после которого комплекс фермент–продукт диссоциирует. GTs типа II обычно имеют общую топологию и состоят из короткого N-концевого цитоплазматического домена, трансмембранного домена и большого каталитического домена, обращенного к просвету Гольджи (Lampugnani et al., 2018).

GTs, принимающие участие в синтезе пектинов, – часть семейства GT8. Внутри семейства GT8 выделяют четыре группы ферментов: гликогенин гликозилтрансферазы; инозитол 1- α -галактозилтрансферазы; галактуринозилтрансферазы; UDP-Gal:гликозид α -1,3-галактозилтрансферазы (Yin et al., 2011). Третья группа включает в себя GTs, принадлежащие к генному семейству *GAUT1*-подобных генов, – они участвуют в полимеризации полисахаридов клеточной стенки растений (Amos, Mohnen, 2019). Семейство *GAUT1*-подобных генов включает в себя 25 генов *A. thaliana*, среди которых 15 генов *GAUT* с идентично-

Таблица 1. Характеристика генов клады GAUT из семейства GT8

Ген	Функция белка	Место экспрессии	Источник
<i>GAUT1</i>	α -1,4-галактуринозилтрансфераза, катализирует присоединение галактуриновой кислоты от UDP-GalA к невосстанавливаемому концу полимеризующегося гомогалактуронана	Все клетки	Sterling et al., 2001
<i>GAUT2</i>	Результат неполной дупликации гена <i>GAUT1</i> ; характерен исключительно для <i>A. thaliana</i>	Не экспрессируется	Caffall et al., 2009
<i>GAUT4</i>	Участвует в синтезе гомогалактуронана	Все клетки	Biswal et al., 2018
<i>GAUT5</i> <i>GAUT6</i>	Связываются в комплекс с <i>GAUT1</i> для закоривания	Пыльники и пыльцевые трубки	Lund et al., 2020
<i>GAUT7</i>	Ассоциируется с <i>GAUT1</i> в комплекс <i>GAUT1:GAUT7</i> , функционирует для закрепления <i>GAUT1</i> на мембране Гольджи	Все клетки	Amos et al., 2018
<i>GAUT8</i>	Принимает участие в синтезе гомогалактуронана и ксилана клеточной стенки	Сосудистые ткани стебля	Bouton et al., 2002; Orfila et al., 2005
<i>GAUT9</i>	Предположительно, участвует в синтезе гомогалактуронана и ксилана	Все клетки	Caffall et al., 2009
<i>GAUT10</i>	Предположительно, участвуют в синтезе гомогалактуронана		
<i>GAUT11</i>	Предположительно, участвуют в синтезе гомогалактуронана		
<i>GAUT12</i>	Участвует в синтезе глюкуроноксила и гомогалактуронана, принимает участие в синтезе вторичных клеточных стенок	Сосудистые ткани	Persson et al., 2007; Caffall et al., 2009
<i>GAUT13</i> <i>GAUT14</i>	Участвуют в синтезе гомогалактуронана, ксилана	Пыльца и пыльцевые трубки	Lund et al., 2020

Примечание: данных о функциональной активности продуктов генов *GAUT3*, *GAUT15* найдено не было.

стью 37–68% (56–84% сходства) с *GAUT1* (Sterling et al., 2006) и 10 *GAUT1*-подобных генов (*GATLs*) с процентом идентичности 39–44% (43–53% сходства) с *GAUT1* (Mohnen, 2008). Сравнительный анализ (табл. 1) генов *GAUT A. thaliana*, *Populus trichocarpa* и *Oryza sativa* позволил классифицировать их на семь клад: клада A-1 (*GAUT 1–3*); A-2 (*GAUT4*); A-3 (*GAUT 5* и *6*); A-4 (*GAUT7*); B-1 (*GAUT 8* и *9*); B-2 (*GAUT 10* и *11*); C (*GAUT 12–15*) (Caffall et al., 2009).

Ген *GAUT1* кодирует белок гомогалактуронан α -1,4-галактуринозилтрансферазу 1 (HG: α 1,4GalAT), являющийся ферментом биосинтеза пектинов с биохимически подтвержденной активностью (Sterling et al., 2001). Фермент *GAUT1* катализирует присоединение галактуриновой кислоты от UDP-GalA к невосстанавливаемому концу полимеризующегося гомогалактуронана (Atmodjo et al., 2011). Сразу после синтеза белок *GAUT1* имеет трансмембранный и каталитический домены, но в процессе посттрансляционных модификаций происходит разрезание между Met167 и Arg168, в результате чего белок утрачивает свой трансмембранный домен. Для того чтобы оставаться связанным с мембраной аппарата Гольджи, белок *GAUT1* формирует комплекс с другой галактуринозилтранс-

феразой – *GAUT7* (Atmodjo et al., 2013). Оба фермента принадлежат к GTII и имеют характерную для этого типа структуру. Последовательности генов, кодирующих белки *GAUT1* и *GAUT7* идентичны на 36%, но несмотря на это белок *GAUT7* не имеет каталитической галактуринозилтрансферазной активности. Он ассоциируется с *GAUT1* в комплексе *GAUT1:GAUT7*, который поддерживается как ковалентными, так и нековалентными взаимодействиями. *GAUT1* является каталитической субъединицей комплекса, а *GAUT7* функционирует, по крайней мере частично, для закрепления *GAUT1* на мембране Гольджи (Amos et al., 2018). Этот комплекс действует на этапе элонгации, но пока остается неизвестным, каким образом происходит инициация синтеза гомогалактуронана и принимает ли в ней участие комплекс *GAUT1:GAUT7*.

GAUT1 и *GAUT7* – наиболее активно экспрессирующиеся гены семейства *GAUT* у *A. thaliana*. Следующий по уровню экспрессии – ген *GAUT4* (Biswal et al., 2018). Белок *GAUT4* имеет очень сходную с *GAUT1* аминокислотную последовательность (83% сходства), что позволяет предполагать сходство функций этих двух ферментов (Caffall et al., 2009). Подавление экспрессии гена

GAUT4 привело к снижению содержания гомо-галактуронана в клетках проса (Biswal et al., 2018).

Продукты генов *GAUT5* и *GAUT6* так же, как и белок *GAUT7*, могут связываться с *GAUT1*. Но, в отличие от *GAUT7*, эти гены активно экспрессируются в основном в пыльниках и пыльцевых трубках, где также принимают участие в синтезе гомо-галактуронана (Lund et al., 2020).

Ген *GAUT2*, вероятно, является результатом неполной дупликации гена *GAUT1*, он характерен исключительно для *A. thaliana*. Это подтверждается отсутствием активного транскрипта, который являлся бы продуктом этого гена. Изменение экспрессии гена *GAUT2* не повлияло на фенотип растений (Caffall et al., 2009).

Другой ген, значимый для биосинтеза пектина и принадлежащий к группе *GAUT*, это *GAUT8/QUA1*, продукт которого имеет 77%-ное сходство по аминокислотной последовательности с *GAUT1*. Этот ген высоко экспрессируется в сосудистых тканях стебля растения (Orfila et al., 2005). У гетерозиготных мутантов *A. thaliana qua1-1* наблюдается сниженная адгезия эпидермальных клеток листьев и клеток верхушки корня (Durand et al., 2009), что приводит к карликовости растений, а гомозиготные мутанты имеют летальный фенотип (Caffall et al., 2009). В клеточных стенках мутантов на 25% снижено количество GalA. В мембранных препаратах стеблей мутантов *qua1-1* снижена активность как α -1,4-GalAT, так и β -1,4-XylT (Orfila et al., 2005). Это позволяет предполагать, что фермент *GAUT8* принимает участие в синтезе не только гомо-галактуронана, но и ксилана клеточной стенки.

Мутанты по генам *GAUT9*, *GAUT10* и *GAUT11* также характеризовались сниженным содержанием GalA в проростках, а *GAUT9* – еще и повышенным содержанием ксилана. Следует подчеркнуть, что явных нарушений адгезии или изменения роста у мутантов по этим генам не наблюдалось (Caffall et al., 2009).

IRX8 – продукт гена *GAUT12* – характеризуется 61%-ным аминокислотным сходством с *GAUT1*. Мутанты *gaut12/irx8* имеют нарушения в ксилеме и более тонкую вторичную клеточную стенку (Persson et al., 2007). Такой фенотип проявляется за счет пониженного содержания глюкуроноксилана и гомо-галактуронана (Caffall et al., 2009). Кроме того, наличие хотя бы одной не мутантной аллели *GAUT12/IRX8*, как и в случае с *GAUT8/QUA1*, необходимо для выживаемости растений, поскольку гомозиготные мутации оказались летальными (Caffall et al., 2009). Наиболее высокий уровень экспрессии гена *GAUT12* наблюдается в сосудистых тканях, в богатых глюкуроноксиланом областях, что позволяет предполагать, что этот ген участвует в синтезе вторичных клеточных стенок у двудольных растений (Persson et al., 2007).

Ферменты, кодируемые генами *GAUT13* и *GAUT14*, принимают активное участие в синтезе гомо-галактуронана в пыльце и пыльцевых трубках. Экспрессия этих генов в пыльцевых трубках оказалась в 6–9 раз больше, чем экспрессия *GAUT1* (Lund et al., 2020). Мутанты *gaut13* и *gaut14* характеризуются повышенным содержанием GalA и пониженным содержанием Xyl и Rha в клеточных стенках. Выявленная коэкспрессия этих генов с *GAUT12* свидетельствует об их участии в синтезе ксилана (Caffall et al., 2009).

Несмотря на то, что для большинства генов семейства *GAUT* была показана их важность в процессе синтеза компонентов клеточной стенки, все имеющиеся на данный момент результаты основаны на изучении мутантов по определенным генам, и точная биохимическая роль для большинства продуктов генов этого семейства до сих пор не подтверждена.

Метилтрансферазы

Важную роль для поддержания структуры клеточной стенки играет метилэтерификация гомо-галактуронана. Галактуроновая кислота в составе гомо-галактуронана большинства клеточных стенок этерифицирована по карбоксильной группе C6 (Derbyshire et al., 2007). Реакцию этерификации катализирует фермент гомо-галактуронан-метилтрансфераза (homogalacturonan methyltransferase, HG-MT). HG-MT связана с мембраной и имеет каталитический домен, расположенный в просвете аппарата Гольджи. В качестве донора метильной группы при этерификации выступает S-аденозилметионин (S-adenosylmethionine, SAM) (Ridley et al., 2001). Предполагается, что растения могут содержать несколько HG-MT, которые отличаются сродством к гомо-галактуронану с разной степенью метилирования (Mohnen, 2008). HG-MT коэкспрессируется с *GAUT1* и *GAUT7*, это указывает на то, что процессы синтеза и этерификации пектина связаны друг с другом (Caffall, Mohnen, 2009). Однако было показано, что синтез все же предшествует этерификации (Atmodjo et al., 2013).

Описано несколько генов, кодирующих предположительные HG-MT, среди которых гены *QUA2* и *QUA3*, принадлежащие семейству *QUA2*. Семейство *QUA2* включает в себя 29 генов *A. thaliana*, для каждого из которых характерен предполагаемый SAM-зависимый MT-домен. Ряд экспериментов показал, что эти гены могут действительно кодировать HG-MT. Мутантные растения *A. thaliana qua2-1* характеризуются карликовым фенотипом, сниженным на 50% содержанием гомо-галактуронана и дефектами в клеточной адгезии (Mouille et al., 2007). В клетках, которые были подвергнуты нокдауну гена *QUA3* посредством РНК-интерференции, пектин был менее этерифицирован, по сравнению с диким типом. Кроме

того, были отмечены изменения в составе и сборке полисахаридов клеточной стенки. Однако нокадаун *QUA3*, в отличие от *QUA2*, никак не повлиял на адгезию клеток (Miao et al., 2011). Помимо генов семейства *QUA2*, предположительную роль в этерификации пектинов может играть белок *CGR3* (cotton Golgi-related 3). При анализе данного белка из *A. thaliana* было показано, что он имеет общие с S-аденозилметионинметилтрансферазами консервативные остатки. *CGR3* локализован в аппарате Гольджи, и ген, его кодирующий, коэкспрессируется с генами биосинтеза пектина. Клеточные стенки мутантов с нокаутом гена *CGR3* имеют сниженный уровень этерификации гомогалактуронана (Held et al., 2011).

Несмотря на все эксперименты с изменением экспрессии генов *QUA2*, *QUA3* и *CGR3*, функциональная активность их белковых продуктов в качестве НГ-МТ биохимически не была подтверждена.

Пектинметилэстеразы и полигалактуроназы

Адгезия клеток растений необходима для поддержания целостности организма, но процесс разделения клеток также важен для протекания некоторых процессов в жизни растения. Разделение клеток после деления происходит за счет двух процессов: деметилирования гомогалактуронана и гидролиза полимерных цепочек. Для осуществления этих процессов в клетках растений существуют ферменты — PME-ы и полигалактуроназы (polygalacturonase, PGs) соответственно (Daher, Braybrook, 2015).

PME-ы имеют активность, обратную метилтрансферазам, — они деметилируют полигалактуронаны клеточных стенок. Семейство генов *PME* включает в себя 68 *PME*-связанных генов у *A. thaliana* (Micheli, 2001). Активность PME-ов необходима для последующей работы полигалактуроназ, которые гидролизуют деэтерифицированный гомогалактуронан. Полигалактуроназы представлены крупным семейством генов, которые являются положительными регуляторами созревания плодов, опадения листьев, роста и расхождения клеток (Xiao et al., 2014).

Различные мутанты *A. thaliana* и других видов растений как по генам пектинметилэстераз, так и по генам полигалактуроназ показали, что оба эти фермента необходимы для разделения клеток в различных частях растений (Bird et al., 1988; Atkinson et al., 2002; Rhee et al., 2003; Francis et al., 2006; Ogawa et al., 2009). Эти эксперименты подтверждают, что PG-опосредованная PME-зависимая деградация пектина — ключевое событие в разделении клеток в онтогенезе растения.

ИССЛЕДОВАНИЯ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ПОИСК СПОСОБОВ СНИЖЕНИЯ АДГЕЗИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ

Межклеточная адгезия, лежащая в основе образования клеточных агрегатов при культивировании клеток растений в жидких питательных средах, — характерная черта любого растения как многоклеточного организма. Формирование агрегатов в культуре клеток растений представляется нежелательным с точки зрения коммерческого использования культур клеток растений в качестве экспрессионных платформ для наработки рекомбинантных белков в биореакторах, а также для получения фармацевтически ценных вторичных метаболитов. Именно этот факт послужил толчком к развитию исследований, направленных на поиск способов снижения адгезионных характеристик клеток растений *in vitro*. Более того, нарушение адгезионных взаимодействий между клетками может послужить одним из способов увеличения метаболических возможностей клеточных культур растений за счет формирования более мелких клеточных агрегатов с большей доступностью компонентов питательной среды составляющим их клеткам.

Первые попытки снижения агрегированности клеточных культур и уменьшения размеров клеточных агрегатов были направлены на разрушение уже сформировавшихся клеточных стенок, что приводило к ослаблению адгезионных взаимодействий между клетками. Для этих целей использовались различные подходы, направленные на разрушение клеточных стенок с применением химических и механических способов (Patil, Roberts, 2013). Успешность применения некоторых из них была связана не только с уменьшением агрегированности отдельных видов клеточных культур, но и приводила к возрастанию их продуктивности в отношении целевых метаболитов.

С накоплением знаний о генетической природе межклеточной адгезии клеток растений, а также с развитием и совершенствованием молекулярных методов, появились способы влияния на адгезивные свойства путем нарушения синтеза конкретных компонентов клеточных стенок. На примере серии Т-ДНК-мутаций *A. thaliana* была продемонстрирована успешность выключения (нокаутов) экспрессии некоторых генов, ответственных за синтез компонентов клеточных стенок. Снижение экспрессии этих генов за счет применения методов РНК-интерференции (нокадауны) также было связано с изменением состава клеточных стенок и ослаблением адгезионных взаимодействий между клетками. Так, например, Т-ДНК-индуцированные мутанты *A. thaliana* с инсерцией в район гена *GAUT4* характеризовались пониженным содержанием гомогалактуронана в клеточных стенках (Caffall et al., 2009). По-

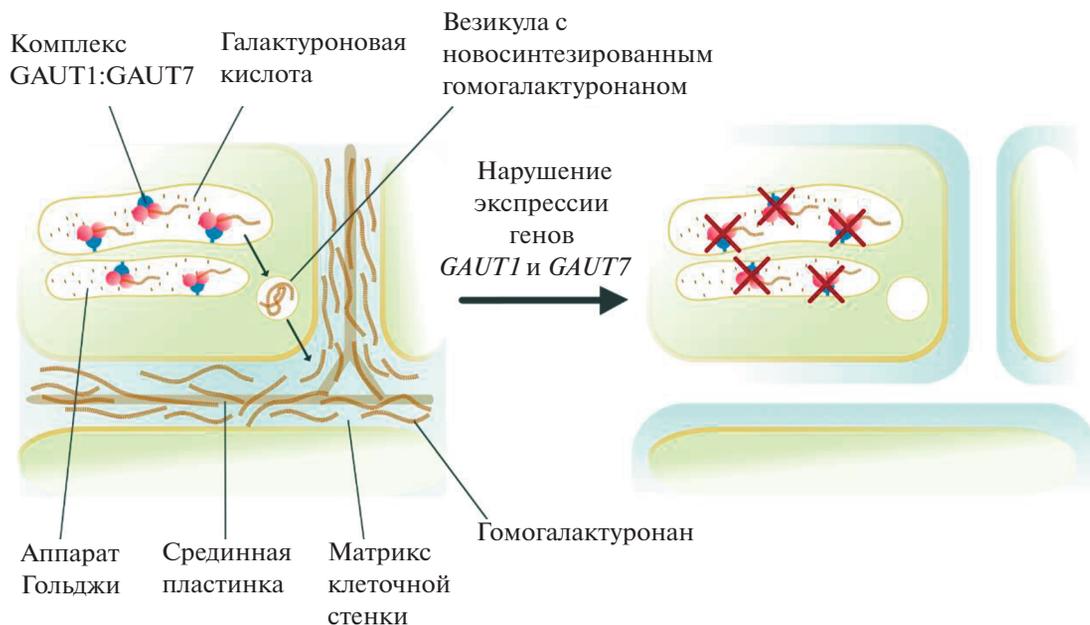


Рис. 4. Гипотетическая схема влияния нарушения экспрессии генов *GAUT1* и *GAUT7* на межклеточные взаимодействия.

давление экспрессии этого же гена методом РНК-интерференции приводило не только к снижению как количества гомогалактуронана, так и содержания рамногалактуронана II, а также к нарушению поперечных кальциевых сшивок между пектиновыми полимерами (Li et al., 2019). Среди Т-ДНК-мутантов по генам *GAUT9*, *GAUT10*, *GAUT11*, *GAUT13*, *GAUT14* наблюдались изменения в количественном содержании галактуроновою кислоты, что может свидетельствовать о нарушениях синтеза пектиновых полимеров (Caffall et al., 2009). Нарушение экспрессии гена *GAUT12* путем РНК-интерференции также приводило к снижению содержания пектиновых полимеров в клеточных стенках (Biswal et al., 2015). Для Т-ДНК-мутантов по гену *GAUT8/QUA1*, помимо изменений в составе клеточных стенок, было показано нарушение межклеточной адгезии и снижение агрегированности в суспензионной культуре клеток *A. thaliana* (Bouton et al., 2002; Orfila et al., 2005).

Помимо генов семейства *GAUT*, нарушение экспрессии которых приводило к изменению строения клеточной стенки, выявлены гены других семейств, нарушение экспрессии которых также приводило к ослаблению адгезионных характеристик клеток растений. Так, нокдаун методом РНК-интерференции гена *QUA3*, принадлежащего семейству генов *QUA* и кодирующего гомогалактуронат метилтрансферазу, был связан с изменениями в составе клеточных стенок *A. thaliana* (Miao et al., 2011). Т-ДНК-мутация по гену *QUA2* привела к снижению количества гомогалактуронана в клеточной стенке и к нарушениям межклеточной

точной адгезии (Mouille et al., 2007). Таким образом, вышеприведенные примеры успешного применения методов инсерционного мутагенеза и РНК-интерференции убедительно демонстрируют, что пути биосинтеза различных компонентов клеток растений, обеспечивающих их адгезионные характеристики, могут быть модифицированы.

Необходимо подчеркнуть, что среди генов семейства *GAUT* наибольший интерес, с точки зрения влияния на межклеточную адгезию и снижение агрегированности, представляют гены *GAUT1* и *GAUT7*, поскольку именно они играют ведущую роль в полимеризации гомогалактуронана (Atmodjo et al., 2011). Можно предполагать, что нарушение структуры этих генов и подавление их экспрессии приведут к снижению синтеза пектинов и нарушению структуры клеточной стенки, что в результате будет связано с ослаблением межклеточной адгезии. Однако пока нет работ, демонстрирующих то, как нарушение экспрессии этих генов влияет на состав клеточных стенок и на взаимодействие клеток растений в суспензионных культурах. На рис. 4 представлена гипотетическая схема возможных последствий выключения генов *GAUT1* и *GAUT7*.

Гены *GAUT1* и *GAUT7* кодируют белки, которые вместе образуют комплекс полимеризации пектинов, расположенный на внутренней стороне мембраны аппарата Гольджи. *GAUT7* служит мембранным якорем для *GAUT1*, который в свою очередь отвечает за присоединение галактуроновою кислоты к полимерной цепи гомогалактуро-

нана. Синтезированные полимеры посредством везикулярного транспорта доставляются к клеточной стенке, где входят в состав срединных пластинок и образуют сайты адгезии клеток растений. Предполагается, что при нарушении структуры генов *GAUT1* и *GAUT7* белковый комплекс *GAUT1:GAUT7* не будет формироваться, вследствие чего нарушится процесс полимеризации гомогалактуронана. Отсутствие в клеточной стенке главного компонента, ответственного за адгезию клеток, может привести к полному их разделению и снижению количества клеток, входящих в состав агрегатов при культивировании суспензий. Уже известны геномные последовательности генов *GAUT1* и *GAUT7* для *A. thaliana* и последовательности их ортологов у других видов растений (Yin et al., 2011), что позволяет применять методы генетического редактирования с использованием направляемых нуклеаз, например Cas9, для получения линий с изменениями в заданных участках интересующих генов.

Создание серии мутаций с нокаутами по генам *GAUT1* и *GAUT7* представляется чрезвычайно перспективным в биотехнологии как с точки зрения практического применения данного подхода для снижения агрегированности клеточных культур растений, так и для решения фундаментальной проблемы, направленной на выявление генов, участвующих в формировании адгезионных характеристик клеток растений. Хорошо разработанные к настоящему времени простые и надежные методы детекции флуоресцентных белков (зеленого флуоресцентного белка и его аналогов) позволят исследователям использовать гены этих белков в качестве целевых для оценки изменения метаболических характеристик клеточной культуры, полученной на основе мутаций по генам, вовлеченным в синтез компонентов клеточной стенки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За счет простоты культивирования, а также наличия механизмов эукариотического фолдинга и посттрансляционных модификаций белков, растительные клеточные культуры являются перспективной платформой для наработки рекомбинантных белков в производственных масштабах. Однако тот факт, что выход белка в растительных клетках существенно ниже, чем в других системах экспрессии, затрудняет их использование. Поскольку низкий выход продукта может быть следствием неоднородности метаболических способностей клеток в разных частях агрегатов, образуемых растительными клетками в суспензиях, то одним из подходов к увеличению накопления целевого продукта может стать снижение размера таких агрегатов.

В основе образования агрегатов лежит характерное для большинства растительных клеток яв-

ление межклеточной адгезии — за счет компонентов клеточных стенок клетки не расходятся полностью после завершения цикла деления. Адгезионные взаимодействия — это комплексное явление, на которое оказывает влияние большое количество различных факторов. Однако показано, что наибольший вклад в адгезию вносят пектины клеточных стенок — благодаря их взаимодействию друг с другом и с другими компонентами клеточных стенок клетки остаются связанными. В синтезе и модификации пектиновых полимеров принимает участие большое количество ферментов, многие из которых кодируются генами, принадлежащими семейству *GAUT*. Показано, что нарушение экспрессии некоторых генов этого семейства приводит к изменению количественного содержания пектинов клеточных стенок, а часть таких мутаций — причина нарушения межклеточной адгезии.

Нарушение экспрессии генов, участвующих в синтезе пектинов, может способствовать изучению влияния различных этапов синтеза пектинов на адгезию, а также выявлению взаимосвязи агрегированности культуры и количества нарабатываемого рекомбинантного белка. Показано, что снижение размера агрегатов влияет на продуктивность культур в отношении вторичных метаболитов, поэтому такая же связь может быть обнаружена и в отношении рекомбинантных белков. Наиболее интересными в данном контексте являются гены, участвующие в формировании главного комплекса полимеризации гомогалактуронана — *GAUT1* и *GAUT7*, поскольку их вклад в адгезию представляется наибольшим.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования, грант № FWNR-2022-0022.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 428 с.
- Загорская А.А., Дейнеко Е.В. Суспензионные культуры клеток растений как платформа для получения рекомбинантных белков // Физиол. раст. 2017. Т. 64. С. 403–417.

- Смоленская И.Н., Решетняк О.В., Смирнова Ю.Н. и др. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов // Физиол. раст. 2007. Т. 54. № 2. С. 243–252.
- Amos R.A., Mohnen D. Critical review of plant cell wall matrix polysaccharide glycosyltransferase activities verified by heterologous protein expression // Front. Plant Sci. 2019. Т. 10. P. 915.
- Amos R.A., Pattathil S., Yang J. et al. A two-phase model for the non-processive biosynthesis of homogalacturonan polysaccharides by the GAUT1:GAUT7 complex // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 49. P. 19047–19063.
- Anderson C.T., Kieber J.J. Dynamic construction, perception, and remodeling of plant cell walls // Annu. Rev. Plant Biol. 2020. V. 71. P. 39–69.
- Atkinson R.G., Schröder R., Hallett I.C. et al. Overexpression of polygalacturonase in transgenic apple trees leads to a range of novel phenotypes involving changes in cell adhesion // Plant Physiol. 2002. V. 129. № 1. P. 122–133.
- Atmodjo M.A., Sakuragi Y., Zhu X. et al. Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex // PNAS USA. 2011. V. 108. № 50. P. 20225–20230.
- Atmodjo M.A., Hao Z., Mohnen D. Evolving views of pectin biosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. V. 64. P. 747–779.
- Baldwin T.C., McCann M.C., Roberts K. A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota* (purification and partial characterization) // Plant Physiol. 1993. T. 103. № 1. C. 115–123.
- Bird C.R., Smith C.J.S., Ray J.A. et al. The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants // Plant Mol. Biol. 1988. V. 11. P. 651–662.
- Biswal A.K., Hao Z., Pattathil S. et al. Downregulation of GAUT12 in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock // Biotechnol. Biofuels. 2015. V. 8. № 1. P. 41.
- Biswal A.K., Atmodjo M.A., Li M. et al. Sugar release and growth of biofuel crops are improved by downregulation of pectin biosynthesis // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. № 3. P. 249–257.
- Borassi C., Sede A.R., Mecchia M.A. et al. An update on cell surface proteins containing extensin-motifs // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. № 2. P. 477–487.
- Bouton S., Leboeuf E., Mouille G. et al. QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2002. V. 14. № 10. P. 2577–2590.
- Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. № 14. P. 1879–1900.
- Caffall K.H., Pattathil S., Phillips S.E. et al. *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutants implicate GAUT genes in the biosynthesis of pectin and xylan in cell walls and seed testa // Mol. Plant. 2009. V. 2. № 5. P. 1000–1014.
- Cumming C.M., Rizkallah H.D., McKendrick K.A. et al. Biosynthesis and cell-wall deposition of a pectin–xyloglucan complex in pea // Planta. 2005. V. 222. № 3. P. 546–555.
- Daher F.B., Braybrook S.A. How to let go: pectin and plant cell adhesion // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 523.
- Derbyshire P., McCann M.C., Roberts K. Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level // BMC Plant Biol. 2007. V. 7. № 1. P. 31.
- Diwan R., Malpathak N. Histochemical localization in *Ruta graveolens* cell cultures: elucidating the relationship between cellular differentiation and furanocoumarin production // Vitro. Cell. Dev. Biol. Plant. 2010. V. 46. № 1. P. 108–116.
- Drakakaki G. Polysaccharide deposition during cytokinesis: challenges and future perspectives // Plant Sci. 2015. V. 236. P. 177–184.
- Durand C., Vitré-Gibouin M., Follet-Gueye M.L. et al. The organization pattern of root border-like cells of *Arabidopsis* is dependent on cell wall homogalacturonan // Plant Physiol. 2009. V. 150. № 3. P. 1411–1421.
- Edahiro J., Seki M. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 102. № 1. P. 8–13.
- Ellinger D., Voigt C.A. Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade // Ann. Bot. 2014. V. 114. № 6. P. 1349–1358.
- Firek S., Draper J., Owen M.R.L. et al. Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures // Plant Mol. Biol. 1993. V. 23. P. 861–870.
- Francis K.E., Lam S.Y., Copenhaver G.P. Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by quartet1, a pectin methyltransferase gene // Plant Physiol. 2006. V. 142. № 3. P. 1004–1013.
- George E.F., Hall M.A., Klerk G.J. Plant propagation by tissue culture // Plant propagation by tissue culture / Eds C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer. Dordrecht: Springer, 2008. P. 283–333.
- Gu Y., Rasmussen C.G. Cell biology of primary cell wall synthesis in plants // Plant Cell. 2022. T. 34. № 1. C. 103–128.
- Haigler C.H. Two types of cellulose synthesis complex knit the plant cell wall together // PNAS USA. 2018. T. 115. № 27. C. 6882–6884.
- Hayashi T., Yoshida K. Cell expansion and single-cell separation induced by colchicine in suspension-cultured soybean cells // PNAS USA. 1988. V. 85. № 8. P. 2618–2622.
- Held M.A., Be E., Zemelis S. et al. CGR3: a Golgi-localized protein influencing homogalacturonan methylesterification // Mol. Plant. 2011. V. 4. № 5. P. 832–844.
- Henshaw G.G., Jha K.K., Mehta A.R. et al. Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth patterns in batch propagated suspension cultures // J. Exp. Bot. 1966. V. 17. № 2. P. 362–377.
- Hulst A.C., Meyer M.M.T., Breteler H., Tramper J. Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1989. V. 30. P. 18–25.

- Huxham I.M., Jarvis M.C., Shakespeare L. et al. Electron-energy-loss spectroscopic imaging of calcium and nitrogen in the cell walls of apple fruits // *Planta*. 1999. V. 208. № 3. P. 438–443.
- Jarvis M.C., Briggs S.P.H., Knox J.P. Intercellular adhesion and cell separation in plants // *Plant. Cell Environ.* 2003. V. 26. № 7. P. 977–989.
- Kieran P.M., Malone D.M., MacLoughlin P.F. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2000. V. 67. P. 139–177.
- Kinnersley A.M., Dougall D.K. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size // *Planta*. 1980. V. 149. № 2. P. 200–204.
- Kolewe M.E., Gaurav V., Roberts S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology // *Mol. Pharm.* 2008. V. 5. № 2. P. 243–256.
- Kolewe M.E., Henson M.A., Roberts S.C. Analysis of aggregate size as a process variable affecting paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures // *Biotechnol. Prog.* 2011. V. 27. № 5. P. 1365–1372.
- Kurz W.G.W. A chemostat for growing higher plant cells in single cell suspension cultures // *Exp. Cell Res.* 1971. V. 64. № 2. P. 476–479.
- Lampugnani E.R., Khan G.A., Somssich M., Persson S. Building a plant cell wall at a glance // *J. Cell Sci.* 2018. V. 131. № 2. P. 1–6.
- Li M., Yoo C.G., Pu Y. et al. Downregulation of pectin biosynthesis gene *GAUT4* leads to reduced ferulate and lignin-carbohydrate cross-linking in switchgrass // *Commun. Biol.* 2019. V. 2. № 1. P. 22.
- Lin S., Miao Y., Huang H. et al. Arabinogalactan proteins: focus on the role in cellulose synthesis and deposition during plant cell wall biogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 12. P. 6578.
- Liau D.F., Boll W.G. Growth and patterns of growth and division of cell suspension cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Contender) // *Canad. J. Bot.* 1971. V. 49. № 7. P. 1131–1139.
- Lund C.H., Stenbæk A., Atmodjo M.A. et al. Pectin synthesis and pollen tube growth in *Arabidopsis* involves three GAUT1 Golgi-anchoring proteins: GAUT5, GAUT6, and GAUT7 // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 585774.
- Manfield I.W., Bernal A.J., Moller I. et al. Re-engineering of the PAM1 phage display monoclonal antibody to produce a soluble, versatile anti-homogalacturonan scFv // *Plant Sci.* 2005. V. 169. № 6. P. 1090–1095.
- McCann M.C., Knox J.P. Plant cell wall biology: polysaccharides in architectural and developmental contexts. Ch. 14 // *Plant polysaccharides: biosynthesis and bio-engineering* / Ed. P. Ulvskov. N.Y.: Wiley-Blackwell, 2010. P. 343–366.
- Miao Y., Li H., Shen J. et al. *QUASIMODO3 (QUA3)* is a putative homogalacturonan methyltransferase regulating cell wall biosynthesis in *Arabidopsis* suspension-cultured cells // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. № 14. P. 5063–5078.
- Micheli F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology // *Trends Plant Sci.* 2001. V. 6. № 9. P. 414–419.
- Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. № 3. P. 266–277.
- Mouille G., Ralet M., Cavalier C. et al. Homogalacturonan synthesis in *Arabidopsis thaliana* requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain // *Plant J.* 2007. V. 50. № 4. P. 605–614.
- Naill M.C., Roberts S.C. Preparation of single cells from aggregated *Taxus* suspension cultures for population analysis // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 86. № 7. P. 817–826.
- Ogawa M., Kay P., Wilson S., Swain S.M. *Arabidopsis* dehiscence zone polygalacturonase1 (ADPG1), ADPG2, and quartet2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2009. V. 21. № 1. P. 216–233.
- Orfila C., Sørensen S.O., Harholt J. et al. *QUASIMODO1* is expressed in vascular tissue of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis // *Planta*. 2005. V. 222. № 4. P. 613–622.
- Parker C.C., Parker M.L., Smith A.C., Waldron K.W. Pectin distribution at the surface of potato parenchyma cells in relation to cell–cell adhesion // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49. № 9. P. 4364–4371.
- Patil R.A., Roberts S.C. Implications of cellular heterogeneity on plant cell culture performance // *Biotechnology for medicinal plants* / Eds S. Chandra, H. Lata, A. Varma. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 207–239.
- Patil R.A., Kolewe M.E., Roberts S.C. Cellular aggregation is a key parameter associated with long term variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures // *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* 2013. V. 112. № 3. P. 303–310.
- Peaucelle A., Braybrook S.A., Guillou L.L. et al. Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in *Arabidopsis* // *Curr. Biol.* 2011. V. 21. № 20. P. 1720–1726.
- Persson S., Caffall K.H., Freshour G. et al. The *Arabidopsis* irregular xylem8 mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity // *Plant Cell.* 2007. V. 19. № 1. P. 237–255.
- Popper Z.A., Fry S.C. Xyloglucan-pectin linkages are formed intra-protoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall // *Planta*. 2008. V. 227. № 4. P. 781–794.
- Prenosil J.E., Heggin M. Self-immobilized plant cell aggregates in a bioreactor system with low shear stress // *Ann. NY Acad. Sci.* 1990. V. 613. № 1. P. 234–247.
- Rhee S.Y., Osborne E., Poindexter P.D., Somerville C.R. Microspore separation in the *quartet 3* mutants of *Arabidopsis* is impaired by a defect in a developmentally regulated polygalacturonase required for pollen mother cell wall degradation // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. № 3. P. 1170–1180.
- Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling // *Phytochemistry*. 2001. V. 57. № 6. P. 929–967.
- Roberts J.A., Gonzalez-Carranza Z. Plant cell separation and adhesion. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2007. 218 p.
- Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. V. 61. P. 263–289.

- Steiner H., Dougall D. K. Ammonium uptake in carrot cell structures is influenced by pH-dependent cell aggregation // *Physiol. Plant.* 1995. V. 95. № 3. P. 415–422.
- Sterling J.D., Quigley H.F., Orellana A., Mohnen D. The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme α -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. № 1. P. 360–371.
- Sterling J.D., Atmondjo M.A., Inwood S.E. et al. Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan galacturonosyltransferase // *PNAS USA.* 2006. V. 103. № 13. P. 5236–5241.
- Takayama S., Misawa M., Ko K., Misato T. Effect of cultural conditions on the growth of *Agrostemma githago* cells in suspension culture and the concomitant production of an anti-plant virus substance // *Physiol. Plant.* 1977. V. 41. № 4. P. 313–320.
- Tan L., Eberhard S., Pattathil S. et al. An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein // *Plant Cell.* 2013. V. 25. № 1. P. 270–287.
- Xiao C., Somerville C., Anderson C.T. Polygalacturonase involved in expansion functions in cell elongation and flower development in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2014. V. 26. № 3. P. 1018–1035.
- Yin Y., Mohnen D., Gelineo-Albersheim I., Xu Y. et al. Glycosyltransferases of the GT8 family // *Annu. Plant Rev.* 2011. V. 41. P. 167–212.
- Zabotina O.A., Zang N., Weerts R. Polysaccharide biosynthesis: glycosyltransferases and their complexes // *Front. Plant Sci.* 2021. V. 12. P. 635307.
- Zhang B., Gao Y., Zhang L., Zhou Y. The plant cell wall: biosynthesis, construction, and functions // *J. Integr. Plant Biol.* 2021. V. 63. № 1. P. 251–272.
- Zhao D., Huang Y., Jin Z. et al. Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production // *Plant Cell Rep.* 2003. V. 21. № 11. P. 1129–1133.
- Zykwinska A., Thibault J., Ralet M. Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 7. P. 1795–1802.

Aggregates Formation in Higher Plants Cell Culture: The Role of Cell Wall Components

E. I. Grigoreva^{a, b, *}, Y. V. Sidorchuk^a, and E. V. Deineko^a

^aFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics,
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

^bNovosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

*e-mail: grigoreva.eln@mail.ru

The use of higher plants cell cultures for recombinant protein production, including medical ones, seems to be promising alternative to existing platforms based on mammalian or bacterial cells. Doubtless advantage of plant cells is a total absence of animal viruses and prions contamination risks, high growth rate, relatively low cultural medium components cost and the ability to ensure the production of recombinant proteins under strictly controlled conditions of bioreactors in accordance with GMP standards (Good Manufacturing Practice). Despite the fact that plant cells are already commercially used for biopharmaceuticals production, there are still many unsolved problems in this direction. The most important ones are rather low level of recombinant protein yield and cells ability to form aggregates during *in vitro* cultivation. Cell aggregates formation that differs on size is a serious problem during the suspension cultures cultivation, especially in large volumes of commercial bioreactors. The basis of aggregate formation in suspension cell cultures is ability of plant cells to adhere. This review considers the features of the plant cell structure, the biochemical mechanisms underlying adhesion and their genetic basis. Perspectives of modern genetic editing methods for altering functioning of genes that takes part in providing plant cells adhesion are considered.

Keywords: plant cell cultures, cell aggregates, intercellular adhesion, *Arabidopsis thaliana*, GAUT family genes

УДК 57.017.35-611.832

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕРВА (ПРОБЛЕМНО-АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР)

© 2022 г. Е. С. Петрова*

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия***e-mail: iempes@yandex.ru*

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.

После доработки 26.06.2022 г.

Принята к публикации 26.06.2022 г.

Настоящий обзор посвящен актуальной проблеме восстановления поврежденных нервов с помощью стволовых клеток. В нем представлен анализ собственных данных и сведений литературы о развитии стволовых клеток мезенхимного и нейрального происхождения в условиях измененного микроокружения при трансплантации в поврежденный нерв лабораторных животных. Проведено сравнение регенеративных потенций пересаженных клеток и сделана оценка их влияния на репаративные процессы в нерве реципиента. Выявление различий воздействия стволовых клеток разного генеза на регенерирующий нерв позволило предположить, что клеточная терапия оказывает влияние на процессы валлеровской дегенерации в ранние сроки после травмы нерва. Сделан вывод о необходимости углубленных фундаментальных исследований молекулярной регуляции процессов валлеровской дегенерации и их изменений под влиянием экзогенных стволовых клеток.

Ключевые слова: регенерация нерва, нейральные стволовые/прогениторные клетки, мезенхимные стволовые клетки, трансплантация

DOI: 10.31857/S0042132422060060

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия активно ведется поиск новых способов стимуляции восстановления поврежденных нервов. В качестве способов улучшения восстановления поврежденных периферических нервных проводников в эксперименте используют воздействие физических факторов: электростимуляции и магнитного поля, применяют новые лекарственные препараты, разрабатывают специальные конструкции — кондуиты, соединяющие проксимальный и дистальный сегменты поврежденного нерва, совершенствуют хирургические способы восстановления целостности нервных проводников, проводят разработку препаратов клеточной и генной терапии (Щаницын и др., 2017; Тутуров и др., 2019; Масгутов и др., 2020; Богов и др., 2021; Ништ и др., 2021; Busuttill et al., 2017; Boldyreva et al., 2018; Sarker et al., 2018; Ehemedah et al., 2019; Mathot et al., 2019; Kubiak et al., 2020; Parker et al., 2021; Idrisova et al., 2022; Lu et al., 2022). В исследованиях последних лет продолжается поиск стволовых клеток (СК), применение которых может стимулировать регенерацию нерва после повреждения (Cofano et al., 2019; Masgutov et al., 2019; Sukhinich et al., 2020a,b; Lavorato et al., 2021; Pan et al., 2021; Siemionow et al., 2022). Следует отметить, что молекулярные механизмы влия-

ния клеточной терапии на ткани реципиента по-прежнему неясны. Трансплантация разных видов СК в поврежденный нерв, в сегмент аутологичного нерва или в кондуит, соединяющий проксимальный и дистальный концы перерезанного нерва, позволяет прояснить ряд вопросов, касающихся взаимоотношений экзогенных и эндогенных клеток, и выдвинуть предположения о механизмах влияния клеточной терапии на дегенерацию и репаративные процессы, происходящие в нерве реципиента после травмы и при различных периферических невропатиях. Целью настоящего обзора стало обобщение собственных данных и сведений литературы о применении для экспериментальной терапии механического повреждения нерва нейральных стволовых/прогениторных клеток и мезенхимных стволовых клеток, полученных из разных источников.

ПРОБЛЕМА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ПРОВОДНИКОВ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

Актуальность изучения восстановления периферических нервов связана с высокой частотой их повреждения при переломах и ушибах верхних и нижних конечностей. Кроме того, сдавление нервных стволов с расстройствами проведения

наблюдает при различных новообразованиях. Расстройства периферической иннервации прослежено при социально значимых заболеваниях: сахарном диабете и рассеянном склерозе. Известно, что нарушение проводимости периферических нервов нередко приводит к инвалидности, что определяет высокую социальную и практическую значимость проблемы.

Изучение регенерации нервов после травмы имеет давнюю историю, начиная с классических исследований (Дойников, 1955; Waller, 1852; Ramon y Cajal, 1928). В настоящее время установлено, что степень успеха восстановления поврежденных нервных проводников зависит от тяжести механической травмы (Sunderland, 1990; Kerns et al., 2021), протяженности дефекта (Шаницын и др., 2017; Siemionow, Brzezicki, 2009) и времени, прошедшего между травмой и операцией (Сотников, 1976; Щедренко и др., 2013; Jonsson et al., 2013).

Применение традиционных хирургических подходов, в частности аутонейропластики, и совершенствование шовной техники не всегда обеспечивает восстановление функций поврежденного нервного проводника. То же касается и кондуитов, соединяющих проксимальный и дистальный сегменты поврежденного периферического нерва. Несмотря на большое разнообразие созданных конструкций (Челышев, Богов, 2008; Шаницын и др., 2017; Valentini et al., 1989; Kemp et al., 2008; Sarker et al., 2018; Sukhinich et al., 2020a), на разработку для них специальных биodeградируемых материалов, на создание наполнителей (скаффолдов), имитирующих структуру эндоневрия, в практической медицине по-прежнему оптимальным методом для соединения дистального и проксимального концов поврежденного проводника остается ауто-трансплантация фрагмента нервного ствола (Grinsell, Keating, 2014; Lovati et al., 2018). Это связано с тем, что искусственные кондуиты не могут обеспечить необходимое для регенерации аксонов микроокружение, в то время как фрагмент донорского нерва, состоящий из нейритов, нейролеммоцитов, клеток кровеносных сосудов, фибробластов и других структурных составляющих эндоневрия, содержит необходимые для роста и регенерации нервных отростков сигнальные молекулы, факторы роста и белки экстрацеллюлярного матрикса.

Восстановление нерва после травмы зависит от тяжести повреждения. Предложена (Sunderland, 1990) классификация степени повреждения нервных проводников по гистологическим признакам, выделено пять степеней тяжести повреждения нерва после травмы. Травма первой степени приводит к временному нарушению проводимости, мотонейроны и нейроны спинальных ганглиев, а также их аксоны при этом не дегенерируют; поражение характеризуется локальной демие-

линизацией. Травма второй степени приводит к нарушению проводимости, непрерывность периневральной и эпиневральной оболочек сохранена. При травме третьей степени происходит поражение эндоневрия, но периневрий и эпиневррий остаются неповрежденными. Восстановление после травмы третьей степени возможно, но может потребоваться хирургическое вмешательство. При повреждении четвертой степени только эпиневррий остается неповрежденным. В этом случае требуется хирургическое лечение. Когда утрачивается непрерывность эндоневрия, в дистальном сегменте происходит валлеровская дегенерация (Wallerian degeneration, WD). Регенерация нейритов затруднена из-за развивающегося отека, сосудистого стаза, ишемии, фиброза, образование рубца усугубляет повреждения пери- и эпиневррия. Травма пятой степени предполагает полное нарушение непрерывности нервного ствола, что приводит к потере двигательной, сенсорной и вегетативной иннервации. При тяжелой травме нерва в результате полной дегенерации аксонов его дистального конца нарушается нейротрофическое влияние на ткани-мишени, что может приводить к необратимой атрофии последних. При abortивной регенерации поврежденного нерва нередко образуется травматическая неврома (Ноздрачев, Чумасов, 1999).

Следует отметить, что повреждения нервных проводников, связанные с нейродегенеративными заболеваниями, в настоящем обзоре не рассматриваются. Патологические механизмы, лежащие в основе механического повреждения нейритов и вторичной их дегенерации вследствие повреждения шванновских клеток и миелина, различны. Многие вопросы о молекулярно-клеточных механизмах развития таких заболеваний (рассеянный склероз, синдром Гийена–Барре и др.) остаются нерешенными (McGonigal et al., 2022) и требуют специального анализа.

Процессы дегенерации и регенерации аксонов в нервном стволе после механического повреждения тесно взаимосвязаны. Для понимания механизмов восстановления нервных волокон и разработки новых способов их стимуляции необходимо исследовать процессы WD. За время, прошедшее с первого описания WD (Waller, 1852) до сегодняшних исследований, структурные изменения в дистальном сегменте поврежденного нерва детально описаны. Молекулярные механизмы, регулирующие эти изменения, до конца не ясны и исследуются в настоящее время с помощью генетических и молекулярно-биологических технологий (Tricaud, Park, 2017).

После повреждения миелинового нервного волокна в течение первых суток наблюдают отслаивание от миелиновых оболочек и дегенерацию осевых цилиндров (Rosell, Neukomm, 2019),

впоследствии происходит биохимический распад миелина. В процессе фагоцитоза продуктов распада миелина участвуют шванновские клетки (ШК, нейролеммоциты), резидентные и гемато-генные макрофаги. В течение первых трех суток после повреждения ШК дистального сегмента нерва проходит этап дедифференцировки. Миелинизирующие ШК преобразуются в немиелини-зирующие клетки, экспрессирующие ряд белков, не свойственных миелинизирующим ШК, и ста-новятся способными к пролиферации и секреции многочисленных цитокинов и сигнальных моле-кул. Они формируют пути последующей регене-рации аксонов, выстраиваясь цепочками в виде так называемых бюнгнеровских тяжей (Jessen, Mirsky, 2016). В период дедифференцировки в них наблюдают ядерную транслокацию β -катенина, повышение экспрессии лизосомальных белков, ак-тивацию аутофагии, реэкспрессию генов, характер-ных для предшественников ШК, и экспрессию ге-нов, несвойственных ни зрелым ШК, ни их предшественникам (Tricaud, Park, 2017). Поэто-му некоторые авторы называют их репарационны-ми ШК (repair Schwann cells) (Jessen, Mirsky, 2016; Zigmond, Echevarria, 2019). Программа дедиффе-ренцировки ШК сопряжена с активацией тран-скрипционного *c-Jun*, который быстро активиру-ется в ШК после повреждения (Jessen, Mirsky, 2016). Показано, что при дедифференцировке ШК задей-ствован также сигнальный путь Notch (Tricaud, Park, 2017). Однако ключевое событие, которое запускает описанный каскад реакций и происхо-дящее в первые часы (возможно, минуты) после травмы, по-прежнему неизвестно.

Практически одновременно с происходящими дегенеративными изменениями в поврежденном нерве начинается регенерация нервных волокон и их рост из проксимального сегмента нерва на периферию. Скорость восстановления нервных во-локон зависит от того, насколько слаженно проис-ходят процессы WD, образование миелиновых овоидов, миграция гематогенных макрофагов, ко-торые, в свою очередь, вместе с популяцией рези-дентных макрофагов выделяют цитокины, при-водящие к активации ШК и способствующие ре-моделированию внеклеточного матрикса.

Одну из ключевых ролей в процессе валлеров-ской демиелинизации играют макрофаги гема-тогенного происхождения (Zigmond, Echevarria, 2019). Эти клетки вместе с другими фагоцитами (резидентными макрофагами и ШК) участвуют в утилизации продуктов распада миелина, препят-ствующих регенерации нервных волокон в повре-жденном нерве. Как и в других тканях, в нерве встречаются макрофаги двух полярных фенотипов — M1 и M2. Макрофаги M1 связаны с провоспали-тельными функциями и нейродегенеративными процессами, макрофаги M2 способствуют репа-ративным процессам (Zigmond, Echevarria, 2019).

В настоящее время особое внимание исследо-вателей привлекают молекулярные механизмы, ко-торые запускают процессы WD, взаимоотношения макрофагов и ШК после травмы и при аутоиммун-ных заболеваниях. Выяснение механизмов молеку-лярно-клеточной регуляции WD позволит предло-жить новые способы стимулирования регенера-ции и сохранения целостности аксонов. В этой связи усилия экспериментальной клеточной те-рапии и генной терапии, направленные на уско-рение роста регенерирующих аксонов, восста-новление их проводимости и на формирование не-обходимого для их регенерации микроокружения, имеют не только практическое, но и важное теоре-тическое значение в области клеточной биологии.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕРВА

За последние четверть века накоплен большой материал по использованию различных СК для терапии травмированного нерва (Петрова, 2012; Kubiak et al., 2020). Сначала в качестве такой те-рапии применяли сингенные ШК (нейролеммоци-ты), в том числе генетически модифицированные генами нейротрофических факторов. Позднее ста-ли использовать эмбриональные СК, СК волося-ных фолликулов, индуцированные плюрипотент-ные СК и др. В настоящее время для эксперимен-тальной терапии нерва эмбриональные СК не применяют, что связано, по-видимому, с их ту-морогенностью (Ревизишин и др., 2017).

В современной регенеративной биомедицине для экспериментальной клеточной терапии наи-более широко используют мезенхимные стволо-вые клетки (МСК), полученные из разных источ-ников (Аругян и др., 2018; Чаплыгина и др., 2022; Mukhamedshina et al., 2019; Murray, Krasno- dembskaya, 2019; Payushina et al., 2022). Для экспе-риментальной клеточной терапии механического повреждения нерва также наиболее часто исполь-зуют МСК (Masgutov et al., 2019; Mathot et al., 2019; Mukhamedshina et al., 2019; Siemionow et al., 2022). В отдельных работах применяют нейральные СК (Gu et al., 2010; Franchi et al., 2012; Xu et al., 2013; Wang et al., 2017). Эксперименты, в которых СК помещают в пересаженный сегмент аутологично-го донорского нерва или в конduit, соединяю-щий проксимальный и дистальный сегменты пе-ререзанного нерва, или непосредственно в повре-жденный нервный ствол, позволяют исследовать влияние их сигнальных молекул и биологически активных веществ на репаративные процессы нерва реципиента.

Многолетний поиск адекватной клеточной те-рапии для нерва связан с разработкой подходов направленного роста аксонов, а также с изучени-ем нейропротекторных факторов для мотонейро-нов и чувствительных нейронов спинальных ган-

глиев, которые могут быть подвержены ретроградным изменениям (хроматолизу и дегенерации) при перерезке нерва. В настоящее время необходимы углубленные фундаментальные исследования свойств СК, благодаря которым они могут оказывать стимулирующее влияние на репаративные процессы, происходящие в нерве после повреждения. Эти исследования касаются выяснения судьбы пересаженных клеток, их дифференцировки в условиях несвойственной для них структурной ниши, особенностей их секретотома, возможностей микровезикулярной передачи информации и др. Необходимость проведения такого анализа актуальна прежде всего для нейральных стволовых/прогениторных клеток, а также МСК, которые чаще других используются в экспериментах по стимуляции регенерации нервов.

СВОЙСТВА НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ОСОБЕННОСТИ ИХ СЕКРЕТОМА

Нейральные стволовые клетки (НСК) – мультипотентные клетки, из которых дифференцируются нейроны, астроциты, олигодендроциты, клетки эпендимы. Нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК) – термин, используемый в регенеративной медицине, введенный для обозначения НСК вместе с ранними коммитированными предшественниками. НСПК описаны в ЦНС взрослых животных и человека: в коре головного мозга, гиппокампе, сетчатке, полосатом теле, обонятельной луковице, в мозжечке и в спинном мозге (Ревещин и др., 2017; Wang et al., 2017; Anderson et al., 2020; Finkel et al., 2021). НСК расположены в определенных нейрогенных структурных нишах, которые содержат молекулярные морфогены и сигнальные молекулы и способствуют поддержке нейрогенеза (Alvarez-Buylla, Lim, 2004).

НСПК, выделенные как из эмбриональных закладок ЦНС, так и из взрослого мозга, нашли широкое применение в регенеративной медицине для терапии нейродегенеративных заболеваний в эксперименте (Ревещин и др., 2017). Показано, что эти клетки способны улучшать регенерацию в ЦНС. Трансплантацию НСПК в эксперименте применяют для терапии нейродегенеративных заболеваний: болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза, нейронного цероидного липофуциноза, болезни Гентингтона, рассеянного склероза, а также при лечении черепно-мозговых травм, травм спинного мозга, инсульта и ряда других патологий (Ревещин и др., 2017; De Gioia et al., 2020; Namestnikova et al., 2020; Finkel et al., 2021).

Первоначально считали, что трансплантация нейрогенных клеток-предшественников в ЦНС может служить заместительной терапией: дифференцируясь в нервные и глиальные клетки, НСК

способны восполнять их недостаток при повреждениях головного и спинного мозга. Есть мнение, что в условиях пересадки экзогенных НСПК в поврежденный нерв они могут дифференцироваться в ШК (Wang et al., 2017). Однако пока предположение о такой трансдифференцировке остается вопросом для дискуссий, предполагают, что это возможно только после предварительной направленной дифференциации НСК в условиях *in vitro* с использованием специальных индукторов. В настоящее время при разработке терапии с использованием НСПК их чаще рассматривают как источник нейротрофических и ростовых факторов.

Секретом НСК подробно описан и проанализирован в ряде обзорных статей (Wang et al., 2017; De Gioia et al., 2020). В секретоме НСК авторы выделяют нейротрофические факторы, факторы роста и другие биологически активные вещества.

Нейротрофические факторы играют важную роль в регуляции дифференцировки, функционирования, синаптогенеза, межклеточных взаимодействий и сохранения жизнеспособности клеточных популяций центральной и периферической нервной системы (ЦНС и ПНС), а также участвуют в репаративных процессах при нейродегенеративных заболеваниях (Попова и др., 2017; Арсентьева, Полякова, 2021; Gomazkov, 2012; Idrisova et al., 2022). К нейротрофическим факторам, вырабатываемым НСК (Wang et al., 2017; De Gioia et al., 2020), относят: нейротрофический фактор мозга (brain derived neurotrophic factor, BDNF), глиальный нейротрофический фактор (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF), фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), нейротрофины 3 и 4 (neurotrophin-3 и neurotrophin-4, NT3 и NT4), цилиарный нейротрофический фактор (ciliary neurotrophic factor, CNTF). Нейротрофические факторы участвуют в нейропротекции, а также в регуляции роста аксонов и в регуляции процесса миелинизации (Wang et al., 2017). Перечисленные свойства НСК и особенности их секретотома определяют естественное стремление исследователей применить их для клеточной терапии поврежденных нервных проводников (Петрова, 2015; Gu et al., 2010; Franchi et al., 2012; Xu et al., 2013; Wang et al., 2017; Sukhinich et al., 2020a).

Помимо нейротрофических факторов, секретом НСК составляют: основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, BFGF), эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor, EGF), инсулиноподобные факторы роста 1 и 2 (insulin-like growth factors, IGF-1 и IGF-2), обладающий нейропротекторным эффектом фактор из пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor, PEDF) (Sanagi et al., 2008; De Gioia et al., 2020). Отмечено также, что НСК синтезируют нейронный кадгерин (N-cadherin, NCAD) (De Gioia et al., 2020).

НСК вырабатывают ряд белков, регулирующих ангиогенез и функционирование эндотелиальной выстилки кровеносных сосудов: галектин-1 (Gal-1), цистатин С, кластерин (Haque et al., 2011; De Miguel et al., 2021). Кроме того, в литературе показано, что под воздействием эстрадиола можно индуцировать дифференцировку экзогенных НСК в эндотелиоциты (Sekiguchi et al., 2013). Авторы, используя двойное маркирование доказали, что пересаженные в поврежденный нерв НСК начинают экспрессировать маркер эндотелия белок CD31. Создана и применяется в различных моделях специальная линия НСК с высокой экспрессией фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) (NSC EpoSV-VEGF) (Oh et al., 2012; Lee et al., 2015, 2016).

НСК могут участвовать в восстановлении поврежденных периферических нервов различными способами, что определяется их способностью синтезировать различные молекулы адгезии, хемокиновые рецепторы, а также цитокины, влияющие на иммунный ответ реципиента (Wang et al., 2017).

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ИХ СЕКРЕТОМ

МСК костного мозга – мультипотентные клетки, способные дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, миоциты, вырабатывающие большое число ростовых и трофических факторов, обладающие способностью модулировать иммунные реакции и влиять на репаративные процессы в различных органах и тканях (Kalina et al., 2011; Yarygin et al., 2016; Petrova, 2018).

Для получения МСК в экспериментальной клеточной терапии используют несколько источников: из костного мозга получают СККМ; из подкожной белой жировой ткани – AD-MSCs (adipocyte mesenchymal stem cells); из тканей плода: пуповинной крови, желе Wharton – UC-MSCs (umbilical cord mesenchymal stem cells); из ткани пульпы взрослого/постоянного зуба – DPSCs (dental pulp stem cells); из скелетных мышц – SkSCs (skeletal muscle stem cells); из эндометрия – МСК эндометрия; из менструальной крови – МСК менструальной крови; из кожи – SDSCs (skin derived stem cells) (Cofano et al., 2019; Lavorato et al., 2021; Payushina et al., 2022).

Начиная с 2001 г. (Dezawa et al., 2001) МСК костного мозга животных и человека применяют в экспериментальных исследованиях, нацеленных на восстановление поврежденных нервных проводников. Результаты исследований последних лет обобщены в нескольких обзорах (Mathot et al., 2019; Lavorato et al., 2021).

Так же как НСК, МСК первоначально рассматривали как возможный потенциал для восстанов-

ления утраченных структур в тканях реципиента. При трансплантации в сердце ожидали их дифференцировку в кардиомиоциты, при трансплантации в мозг – в нейроны и астроциты, а при трансплантации в поврежденный нерв или кондуит, соединяющий сегменты нерва, надеялись на их дифференцировку в ШК, участвующие в дегенеративных и репаративных процессах в дистальном сегменте нерва после травмы (Jessen, Mirsky, 2016; Wong et al., 2017). Однако оказалось, что для получения ШК из МСК необходима предварительная направленная дифференциация в условиях *in vitro* с помощью специальных индукторов (Dezawa et al., 2001; Lavorato et al., 2021). В практическом смысле такие разработки некоторыми авторами ставятся под сомнение (Lavorato et al., 2021).

Дискуссия о том, каков механизм влияния МСК – их дифференцировка и замещение погибших клеток или выработка ими биологически активных веществ – продолжается и сегодня. В современных работах особое внимание уделяют популяции МСК, которую называют многолинейно-дифференцирующимися стрессоустойчивыми клетками (multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells) (Kuroda et al., 2010, 2011, 2013).

Клетки Muse составляют всего несколько процентов от МСК костного мозга, присутствуют в разных тканях, идентифицируются с помощью SSEA-3⁺ и обладают плюрипотентностью (Dezawa, 2016). При этом, в отличие от эмбриональных и индуцированных СК, они не обладают туморогенностью. Клетки Muse не нужно индуцировать или проводить генетические манипуляции. Их вводят внутривенно, после чего они способны самостоятельно мигрировать к месту повреждения. Аллогенные клетки Muse остаются в ткани хозяина в виде дифференцированных клеток более полугода. Показан их благоприятный эффект на улучшение сердечной функции, их применение уменьшает зону инфаркта в модельных экспериментах на кроликах (Yamada et al., 2022). Также клетки Muse способны дифференцироваться в нейроны. Отмечено их положительное влияние на восстановительные процессы в поврежденном спинном мозге у грызунов (Kajitani et al., 2021). Описаны отдельные клинические испытания применения этих клеток для лечения инфаркта миокарда, инсульта и буллезного эпидермолиза (Dezawa et al., 2019).

Однако в последние годы многие исследователи видят терапевтический эффект МСК не столько в их дифференцировке, сколько в трофическом влиянии на эндогенные клетки тканей реципиента секретируемых ими факторов. В аналитических обзорах последних лет, которые посвящены изучению секрета МСК, отмечают большое разнообразие вырабатываемых ими биологически активных веществ (Пронина и др., 2019; Ки-

селевский и др., 2021; Chinnadurai et al., 2018; Baez-Jurado et al., 2019). Секретом МСК включает в себя ростовые, антиоксидантные, ангиогенные, иммуносупрессивные и другие факторы, способные оказывать репаративное, антиапоптотическое, противовоспалительное, антифибротическое и антибактериальное влияние на ткани. Среди ростовых факторов описаны BFGF, EGF, трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor beta, TGF- β), тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF), фактор роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor, HGF); к ангиогенным относят BFGF, VEGF, щелочную фосфомоноэстеразу. МСК секретируют комплекс цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ) и хемокинов (CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11 и др.) и также могут проявлять провоспалительную активность (Киселевский и др., 2021).

Рассматривая проблему восстановления поврежденных нервных проводников, важно отметить нейротрофические факторы, вырабатываемые мезенхимными стволовыми клетками: NGF, BDNF, GDNF, CNTF, нейрегулин-1, NT3, NT4, нейротрофин-1 (Resch et al., 2018; Cofano et al., 2019).

Показано, что МСК могут индуцировать ангиогенез (прораствание новых кровеносных сосудов из ранее существовавших) посредством секреции тканевого ингибитора металлопротеиназы-1, VEGF, ангиопоэтина-1, HGF, PDGF, IL-6 и IL-8 (Cofano et al., 2019).

В настоящее время для изучения физиологической роли различных компонентов секрета МСК используют их микровезикулы. Показано, что микровезикулы МСК-EV могут переносить от МСК к клеткам-мишеням рецепторы, факторы роста, липиды и различные типы РНК, включая регуляторные микроРНК (Basalova et al., 2020; Takeuchi et al., 2021). Установлено, что полученные из МСК микровезикулы способны встраиваться в нейроны и клетки микроглии, проявляя при этом нейротрофическое действие (Xin et al., 2020).

Таким образом, проведенный анализ показал, что МСК отличаются от СК нейрогенного происхождения составом своего секрета — синтезируя практически все нейротрофические факторы, свойственные НСК, они вырабатывают более широкий спектр ангиогенных белков и цитокинов. Это следует учитывать при выборе способа клеточной терапии повреждений нервных проводников.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НСПК И МСК В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ТРАВМЕ НЕРВА

Применение разработанной в Отделе общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины стандартизированной модели

трансплантации СК в поврежденный седалищный нерв взрослых крыс позволило провести сравнительное исследование субпериневральной трансплантации НСПК и МСК, выполненной с целью выяснения особенностей их дифференцировки в условиях измененного микроокружения и их влияния на репаративные процессы в нерве реципиента.

Трансплантацию НСПК, полученных путем диссоциации эмбриональных закладок ЦНС и ПНС, под периневрий крыс-реципиентов осуществляли однократно и изучали состояние трансплантатов в течение двух месяцев (Петрова, 2015). Пересаженные клетки после трансплантации обнаружены в месте пересадки — в нервном стволе седалищного нерва, часть из них сохраняет жизнеспособность в течение 60 сут и дифференцируется в нейроны и глиоциты. Степень выживаемости и направление дифференцировки пересаженных НСПК зависит от эмбриональной стадии развития донора (Sukhinich et al., 2020a).

Показано, что диссоциированные клетки эмбриональных закладок ЦНС продолжают дифференцироваться в глиальном и нейрональном направлениях (Петрова, 2015). Через 30–60 сут после трансплантации в толще нервного ствола в окружении нервных волокон реципиента наблюдали небольшие скопления клеток, содержащих ядерный антиген NeuN, являющийся селективным маркером нервных клеток (Алексеева и др., 2015). Установлено, что диссоциированные клетки эмбриональных закладок реализуют свои гистобластические потенции и дифференцируются в нейроны и глиоциты, свойственные соответствующим закладкам. Так, при пересадке меченных бромдезоксисуридином НСПК спинального ганглия крысы через 21–60 сут после операции в трансплантатах обнаруживают скопления чувствительных нейронов с характерной для них округлой формой, большим ободком цитоплазмы и крупным ядром с четко выраженными ядрышками. Среди глиоцитов встречают клетки, подобные клеткам-сателлитам, синтезирующие белок S100 (Петрова, 2015). Если для трансплантации в нерв использовали взвесь диссоциированных клеток периферного мозгового пузыря, то часть пересаженных клеток дифференцировалась в нейроны, часть — в эпендимоциты (Петрова, 2015).

Дальнейшие исследования, посвященные сравнению субпериневральной трансплантации в нерв нейрогенных и мезенхимных СК, показали, что сроки выживания НСПК и МСК костного мозга крыс после трансплантации в поврежденный седалищный нерв взрослого животного различны. По-разному происходит и дифференцировка этих клеток в условиях измененного микроокружения.

В отличие от НСПК, экзогенные меченные бромдезоксисуридином МСК выявляются в нерве реципиента непродолжительное время (5–7 сут) (Петрова et al., 2018a). В более поздние сроки они перестают идентифицироваться, вероятно, большинство из них дегенерирует. На вопрос о перио-

де выживания МСК после пересадки в поврежденный нерв или кондуит, соединяющий проксимальный и дистальный сегменты перерезанного нерва, невозможно ответить однозначно. Срок выживания клеток в условиях измененного микроокружения зависит от вида СК, манипуляций, которым подвергали клетки при выделении и трансплантации, а также от их свойств. Показано, что МСК, выделенные из пупочного канатика, способны выживать в течение двух недель после пересадки (Gärtner et al., 2014). Другими авторами на других экспериментальных моделях отмечено непродолжительное время выживания экзогенных МСК (Weiss et al., 2019). Установлено, что экзогенные МСК после введения крысам с острым респираторным дистресс-синдромом погибали по механизмам аутофагии и апоптоза (Weiss et al., 2019).

В отличие от диссоциированных клеток эмбриональных закладок ЦНС и ПНС, трансплантированные МСК после операции обнаруживали не только в месте пересадки, то есть под периневрием в толще нервного ствола, но и в эпиневральной и периневральной оболочках нерва реципиента. Нередко пересаженные меченные бромдезоксифлуоридом МСК наблюдали в составе стенок регенерирующих кровеносных сосудов эпиневрия. Проникновение пересаженных субпериневрально МСК в оболочки нерва реципиента объясняют нарушением гематоневрального барьера после процедур передавливания нерва и трансплантации клеток, а также способностью МСК к миграции (Kalinina et al., 2011; Petrova, 2018). Часть пересаженных МСК обнаруживали в толще нерва крысы-реципиента между нервными волокнами. Предположительно они могут дифференцироваться в направлении ШК, эндоневральных фибробластов, клеток кровеносных сосудов. Та часть МСК, которую обнаруживали в оболочках нерва реципиента, была сосредоточена вокруг кровеносных сосудов и в жировой ткани эпиневрия. Отдельные экзогенные МСК дифференцируются в адипоциты эпиневрия и периневральные клетки (Petrova et al., 2018a).

Позднее было установлено, что влияние трансплантатов МСК и НСПК на репаративные процессы, происходящие в поврежденном нерве реципиента (его васкуляризацию, регенерацию аксонов и разрастание эпиневральной и периневральной оболочек), различно (Петрова и др., 2021; Petrova et al., 2018b, 2021; Petrova, Kolos, 2021). После введения МСК, но не НСПК, в эндоневрии нерва реципиента возрастала плотность микрососудов и утолщались периневральная и эпиневральная оболочки. Изменение васкуляризации и структурные изменения в оболочках дистального сегмента нерва после повреждения и применения МСК сопряжены с особенностями секрета этих клеток. Как отмечено в предыдущих разделах настоящего обзора, МСК вырабатывают большее число разнообразных ангиогенных факторов, чем нейрогенные предшественники. Кроме того, они секретируют адипогенные факторы: FGF (fi-

broblast growth factor), IGF-1 и могут влиять на адипогенез в эпиневрии нерва реципиента.

Сравнительное исследование трансплантатов диссоциированных клеток эмбрионального спинного мозга (СМ) и МСК показало, что их влияние на регенерацию аксонов реципиента также различно. После введения нейрогенных предшественников, полученных из эмбриональных закладок спинного мозга, в дистальном сегменте поврежденного нерва наблюдается увеличение числа регенерирующих нервных волокон, по сравнению с животными контрольной группы, седалищный нерв которых поврежден путем наложения лигатуры, но вместо суспензии клеток введена культуральная среда в том же объеме (Петрова, 2015). Это свидетельствует о том, что под влиянием клеточной терапии скорость роста нервных волокон возрастает. Следует отметить, что при использовании НСПК из других эмбриональных закладок (клеток стенки переднего мозгового пузыря или эмбриональных спинальных ганглиев) такого эффекта не наблюдается (Петрова, 2015). Это может быть связано с особенностями секрета клеток эмбрионального СМ, с медиаторами и нейропептидами, синтезирующимися нейронами СМ. Клетки из эмбриональной закладки СМ наиболее родственны седалищному нерву, поскольку большинство нервных волокон в его составе представлены отростками нейронов СМ.

Другое предположение касается того факта, что пересаженные в нерв предшественники двигательных нейронов, дифференцируясь, простирают свои отростки на периферию, увеличивая тем самым число регенерирующих волокон в дистальном сегменте поврежденного нерва. О возможности роста аксонов пересаженных нейронов на периферию свидетельствуют выполненные в 1990-е гг. работы по трансплантации эмбрионального спинного мозга в дистальный конец перерезанного нерва (Erb et al., 1993; Petrova et al., 1998; Thomas et al., 2000). Результаты этих исследований находят подтверждение и в настоящее время. Показано, что клетки эмбрионального ганглия дорзального корешка, пересаженные в дистальный конец поврежденного нерва, индуцируют регенерацию чувствительных нервных волокон и реиннервацию мышц (Asano et al., 2019).

Исследование влияния одноразовой субпериневральной трансплантации МСК в седалищный нерв крысы показало, что такая пересадка способствует увеличению через 2 мес. после операции доли толстых регенерирующих нервных волокон в его дистальном конце (Petrova, Kolos, 2021). Мы полагаем, что пересаженные в поврежденный нерв МСК, вырабатывая нейротрофические и ростовые факторы, создают благоприятное микроокружение для регенерации нервных волокон и могут ускорять репаративные процессы — рост регенерирующих аксонов, увеличение их калибра, их миелинизацию. Можно также предположить, что благодаря паракринному влиянию МСК

на эндогенные клетки нерва реципиента (нейролеммоциты, фибробласты, клетки периневрия, клетки стенок кровеносных сосудов, макрофаги) их трансплантация способствует сохранности единичных нервных волокон после передавливания. Для решения этого вопроса необходимы дальнейшие исследования, выполненные на более ранних сроках после операции (повреждения нерва и трансплантации МСК), в период WD.

В настоящее время вопрос о влиянии клеточной терапии на процессы WD, развивающейся в поврежденном нерве реципиента, не решен и исследования в этом направлении не проводятся.

Важную роль в WD играют макрофаги. Из мигрирующих из кровотока моноцитов дифференцируются провоспалительные макрофаги (M1, CD68⁺), которые впоследствии приобретают новый фенотип и становятся противовоспалительными (M2, CD206⁺) (Murray et al., 2014; Ehmedah et al., 2020). Макрофаги M1, экспрессирующие TNF- α , IL-1 β , IL-6 и другие провоспалительные белки, необходимы для дальнейшей регенерации нерва. Одна из их функций состоит в обеспечении стерильного воспаления (Kalinski et al., 2020). При нарушении гематоневрального барьера наряду с моноцитами в эндоневрий попадают гранулоциты, которые вскоре подвергаются апоптозу и фагоцитируются макрофагами (Kalinski et al., 2020). Однако в литературе описаны данные о том, что нейтрофилы, мигрирующие из кровотока в поврежденный нерв, могут принимать участие в фагоцитозе продуктов распада миелина наряду с макрофагами (Niemi et al., 2020).

Переход M1 в M2 происходит на третьи сутки после травмы нерва. M2-тип участвует в подавлении реакции воспаления и доминирует в нерве через 7–14 сут после травмы. Он характеризуется экспрессией IL-10 (Mietto et al., 2015), IL-6, TNF- β . Считают, что регуляцию функций макрофагов осуществляют ШК (Stratton, Shah, 2016), однако молекулярные механизмы этих взаимодействий недостаточно изучены.

На разных экспериментальных моделях показано, что экзогенные МСК способны подавлять воспалительную реакцию в поврежденных тканях. На модели острого респираторного дистресс-синдрома у мышей установлено, что введение МСК влияет на поляризацию макрофагов. МСК индуцируют фенотип макрофагов, у которых наблюдают ингибирование воспалительных цитокинов, повышение фагоцитарной способности, увеличение экспрессии CD206 (Morrison et al., 2017). Установлено, что механизмы влияния МСК на переход M1 в M2 разнообразны: через цитоплазматические нанотрубки, путем транспорта микровезикул и вследствие клеточного слияния (Murray, Krasnodembskaya, 2019).

В случае повреждения нерва вопрос о влиянии экзогенных МСК на макрофагальную реакцию неясен. Можно допустить, что клеточная терапия приведет к иным последствиям в отношении по-

ляризации макрофагов, по сравнению с описанной моделью, поскольку популяция макрофагов периферических нервов считается уникальной. Эта популяция сформирована под влиянием особого микроокружения и обладает только ей свойственной функцией: фагоцитировать продукты распада миелина (Ehmedah et al., 2020).

Дискуссионным остается вопрос о том, есть ли необходимость снижать воспалительную реакцию в травмированном нерве для улучшения его восстановления. Если травма нерва незначительна и не приводит к деструкции нервных волокон и к развитию WD – первая степень повреждения (Sunderland, 1990), – применение МСК может способствовать сохранности миелиновых оболочек, ингибируя фагоцитарную реакцию макрофагов. В случае же возникновения WD экзогенные МСК могут повлиять на миграцию макрофагов и вызвать задержку утилизации продуктов распада миелина, которая, как отмечалось ранее, составляет необходимый процесс для нормального роста регенерирующих аксонов и их ремиелинизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей статье рассмотрена проблема применения клеточных технологий для восстановления поврежденных периферических нервов. Сравнительный анализ трансплантации в поврежденный нерв стволовых клеток разного генеза (МСК и НСПК) показал, что они по-разному влияют на репаративные процессы, развивающиеся в дистальном сегменте нерва после травмы, в том числе на васкуляризацию, регенерацию аксонов и структуру соединительнотканых внешних оболочек. Для понимания причин выявленных различий, а также для выяснения механизмов влияния клеточной терапии на регенерацию нерва реципиента необходимо изучение воздействия экзогенных клеток на процессы WD, происходящие в нерве в ранние сроки после повреждения. Проведенный анализ позволяет сделать предположение о том, что клеточная терапия с применением МСК может быть эффективным способом стимуляции регенерации нерва только в том случае, если травма нерва не приводит к разрушению аксона и развитию WD в дистальном сегменте поврежденного нерва. Присутствие экзогенных МСК, модулирующих воспалительный процесс, может привести к нарушению каскада реакций, происходящих в период WD, и тем самым способствовать задержке регенерации. Для выяснения молекулярных механизмов, регулирующих дегенеративные и репаративные процессы в поврежденном нерве, необходимы дальнейшие фундаментальные исследования. Экспериментальная клеточная терапия с применением СК, выступая в качестве модели изучения участвующих в восстановлении нерва клеток (нейролеммоцитов, макрофагов, эндоневральных фибробластов и др.), дает возможность исследовать клеточные взаимодействия и механизмы их регуляции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа финансировалась из средств государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор информирует об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеева О.С., Гусельникова В.В., Безнин П.М., Коржевский Д.Э.* Перспективы использования ядерного белка NeuN в качестве показателя функционального состояния нервных клеток у позвоночных // Журн. эвол. биохим. физиол. 2015. Т. 51. № 5. С. 313–323.
- Арсентьева Е.В., Полякова Д.И.* Нейрорегенерация и нейропротекция: перспективы клинического применения факторов роста и других биоактивных веществ // Мед. альянс. 2021. Т. 9. № 1. С. 82–90.
- Арутюнян И.В., Фатхудинов Т., Ельчанинов А.В. и др.* Исследование механизмов терапевтической активности аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика в модели ишемии задних конечностей крыс // Гены и клетки. 2018. Т. 13. № 1. С. 82–89.
- Богов А.А., Галлямов А.Р., Данилов В.И. и др.* Сравнительный анализ применения клеток стромальной васкулярной фракции жировой ткани и генно-терапевтической плазмиды pBUD-VEGF165-FGF2 при экспериментальной аутонервной вставке седалищного нерва крысы // Политравма. 2021. № 2. С. 103–108.
<https://doi.org/10.24412/1819-1495-2021-2-103-108>
- Дойников Б.С.* Избранные труды по нейроморфологии и невропатологии. М.: Медгиз, 1955. 468 с.
- Киселевский М.В., Власенко Р.Я., Степанян Н.Г. и др.* Секретом мезенхимных стволовых клеток костного мозга: иммуносупрессивный или провоспалительный? // Клет. технол. биол. мед. 2021. № 3. С. 171–175.
- Масгутов Р.Ф., Масгутова Г.А., Мухаметова Л.Р. и др.* Результаты сравнительной оценки эффективности применения плазмидной конструкции pBUD-VEGF165-FGF2 в моделях аутонервной пластики дефекта седалищного нерва и тубуляции коллагеновой трубкой NeuraGen® // Гены и клетки. 2020. Т. 15. № 4. С. 61–65.
<https://doi.org/10.23868/202012010>
- Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И.* Периферическая нервная система. СПб.: Наука, 1999. 281 с.
- Нишит А.Ю., Фомин Н.Ф., Орлов В.П.* Топографо-анатомические и нейрохирургические аспекты восстановления периферических нервов по типу “копец-в-бок” // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. 2021. № 1 (73). С. 121–128.
- Петрова Е.С.* Применение стволовых клеток для стимуляции регенерации поврежденного нерва // Цитология. 2012. № 7. С. 525–540.
- Петрова Е.С.* Поиск способов стимуляции регенерации поврежденного нерва с помощью новых клеточных технологий // Мед. акад. журн. 2015. Т. 15. № 4. С. 7–19.
- Петрова Е.С., Колос Е.А., Исаева Е.Н.* Трансплантация в поврежденный нерв крысы диссоциированных клеток эмбрионального спинного мозга и МСК (сравнительное исследование) // Вопросы морфологии XXI века. Выпуск 6 / Ред. И.А. Одинцова, С.В. Костюкевич. СПб.: Изд-во ДЕАН, 2021. С. 127–130.
- Попова Н.К., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С.* Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга // Биохимия. 2017. Т. 82. № 3. С. 449–459.
- Пронина Е.А., Масляков В.В., Степанова Т.В. и др.* Анализ механизмов регенерации при аутотрансплантации // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2019. Т. 27. № 3. С. 393–406.
<https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2019273393-406>
- Ревизиц А.В., Павлова Г.В., Охотин В.Е., Яковлева К.А.* Клеточная терапия при нейродегенеративных заболеваниях. М.: МПГУ, 2017. 160 с.
- Сотников О.С.* Функциональная морфология живого мягкотного нервного волокна. Л.: Наука, 1976. 99 с.
- Тутуров А.О., Пятин В.Ф., Сергеев С.М.* Перспективы развития технологий восстановления протяженных дефектов нервов с помощью кондуитов // Политравма. 2019. № 2. С. 95–101.
- Чаплыгина А.В., Жданова Д.Ю., Ковалев В.И. и др.* Клеточная терапия как способ коррекции нарушений нейрогенеза во взрослом мозге в модели болезни Альцгеймера // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2022. Т. 108. № 1. С. 59–84.
- Чельшев Ю.А., Богов А.А.* Экспериментальное обоснование применения кондуитов нерва // Неврол. вестн. 2008. Т. 40. № 4. С. 101–109.
- Щаницын И.Н., Иванов А.Н., Бажанов С.П. и др.* Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы // Успехи физиол. наук. 2017. Т. 48. № 3. С. 92–112.
- Щедренко В.В., Гуманенко Е.К., Кирьянова В.В. и др.* Принципы ранней хирургической реабилитации нейротравмы // Вестн. хирург. им. И.И. Грекова. 2013. Т. 172. № 5. С. 51–55.
- Alvarez-Buylla A., Lim D.A.* For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain // Neuron. 2004. V. 41. № 5. P. 683–686.
- Anderson J., Patel M., Forenzo D. et al.* A novel mouse model for the study of endogenous neural stem and progenitor cells after traumatic brain injury // Exp. Neurol. 2020. V. 325. P. 113119.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113119>
- Asano K., Nakano T., Tokutake K. et al.* Muscle spindle reinnervation using transplanted embryonic dorsal root ganglion cells after peripheral nerve transection in rats // Cell Prolif. 2019. V. 52. № 5. P. e12660.
<https://doi.org/10.1111/cpr.12660>
- Baez-Jurado E., Hidalgo-Lanussa O., Barrera-Bailón B. et al.* Secretome of mesenchymal stem cells and its potential protective effects on brain pathologies // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. № 10. P. 6902–6927.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1570-x>

- Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M. et al.* Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles // *Cells*. 2020. V. 9. № 5. P. 1272. <https://doi.org/10.3390/cells9051272>
- Boldyreva M.A., Bondar I.V., Stafeev I.S. et al.* Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury // *Biomed. Pharmacother.* 2018. № 101. P. 682–690.
- Busuttill F., Rahim A.A., Phillips J.B.* Combining gene and stem cell therapy for peripheral nerve tissue engineering // *Stem Cells Dev.* 2017. V. 26. № 4. P. 231–238.
- Chinnadurai R., Rajan D., Qayed M. et al.* Potency analysis of mesenchymal stromal cells using a combinatorial assay matrix approach // *Cell Rep.* 2018. V. 22. № 9. P. 2504–2517.
- Cofano F., Boido M., Monticelli M. et al.* Mesenchymal stem cells for spinal cord injury: current options, limitations, and future of cell therapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 2698. <https://doi.org/10.3390/ijms20112698>
- De Gioia R., Biella F., Citterio G. et al.* Neural stem cell transplantation for neurodegenerative diseases // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 9. P. 3103. <https://doi.org/10.3390/ijms21093103>
- De Miguel Z., Houry N., Betley M.J. et al.* Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation via clusterin // *Nature*. 2021. V. 600. № 7889. P. 494–499. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04183-x>
- Dezawa M.* Muse cells provide the pluripotency of mesenchymal stem cells: direct contribution of Muse cells to tissue regeneration // *Cell Transplant.* 2016. V. 25. № 5. P. 849–861. <https://doi.org/10.3727/096368916X690881>
- Dezawa M., Takahashi I., Esaki M. et al.* Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells // *Eur. J. Neurosci.* 2001. V. 14. P. 1771–1776.
- Dezawa M., Niizuma K., Tominaga T.* Actualization of neural regenerative medicine by intravenous drip of donor-derived Muse cells // *Brain Nerve.* 2019. V. 71. № 8. P. 895–900. <https://doi.org/10.11477/mf.1416201372>
- Ehmedah A., Nedeljkovic P., Dacic S. et al.* Vitamin B complex treatment attenuates local inflammation after peripheral nerve injury // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 4615. <https://doi.org/10.3390/molecules24244615>
- Ehmedah A., Nedeljkovic P., Dacic S. et al.* Effect of vitamin B complex treatment on macrophages to Schwann cells association during neuroinflammation after peripheral nerve injury // *Molecules*. 2020. V. 25. № 22. P. 5426. <https://doi.org/10.3390/molecules25225426>
- Erb D.E., Mora R.J., Bunge R.P.* Reinnervation of adult rat gastrocnemius muscle by embryonic motoneurons transplanted into the axotomized tibial nerve // *Exp. Neurol.* 1993. V. 124. P. 372–376.
- Finkel Z., Esteban F., Rodriguez B. et al.* Diversity of adult neural stem and progenitor cells in physiology and disease // *Cells*. 2021. V. 10. P. 2045. <https://doi.org/10.3390/cells10082045>
- Franchi S., Valsecchi A.E., Borsani E. et al.* Intravenous neural stem cells abolish nociceptive hypersensitivity and trigger nerve regeneration in experimental neuropathy // *Pain*. 2012. V. 153. P. 850–861.
- Gärtner A., Pereira T., Armada-da-Silva P. et al.* Effects of umbilical cord tissue mesenchymal stem cells (UCX[®]) on rat sciatic nerve regeneration after neurotmesis injuries // *J. Stem Cells Regen. Med.* 2014. V. 10. № 1. P. 14–26. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1001004>
- Gomazkov O.A.* Neurotrophins: the therapeutic potential and concept of minipeptides // *Neurochem. J.* 2012. T. 6. № 3. C. 163–172.
- Grinsell D., Keating C.P.* Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies // *BioMed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 698256. <https://doi.org/10.1155/2014/698256>
- Gu S., Shen Y., Xu W. et al.* Application of fetal neural stem cells transplantation in delaying denervated muscle atrophy in rats with peripheral nerve injury // *Microsurgery*. 2010. V. 30. P. 266–274.
- Haque A., Banik N.L., Ray S.K.* Molecular alterations in glioblastoma: potential targets for immunotherapy // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011. V. 98. P. 187–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385506-0.00005-3>
- Idrisova K.F., Zeinalova A.K., Masgutova G.A. et al.* Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury // *Neural Regen. Res.* 2022. V. 17. № 6. P. 1240–1247. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.327329>
- Jessen K.R., Mirsky R.* The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves // *J. Physiol.* 2016. V. 594. № 13. P. 3521–3531.
- Jonsson S., Wiberg R., McGrath A.M. et al.* Effect of delayed peripheral nerve repair on nerve regeneration, Schwann cell function and target muscle recovery // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e56484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056484>
- Kajitani T., Endo T., Iwabuchi N. et al.* Association of intravenous administration of human Muse cells with deficit amelioration in a rat model of spinal cord injury // *J. Neurosurg. Spine*. 2021. V. 34. № 4. P. 648–655. <https://doi.org/10.3171/2020.7.SPINE20293>
- Kalinina N.I., Syssoeva V.Y., Rubina K.A. et al.* Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair // *Acta Naturae*. 2011. V. 3. № 4. P. 30–37.
- Kalinski A.L., Yoon C., Huffman L.D. et al.* Analysis of the immune response to sciatic nerve injury identifies efferocytosis as a key mechanism of nerve debridement // *Elife*. 2020. V. 9. P. e60223. <https://doi.org/10.7554/eLife.60223>
- Kemp S.W., Walsh S.K., Midha R.* Growth factor and stem cell enhanced conduits in peripheral nerve regeneration and repair // *Neurol. Res.* 2008. V. 30. № 10. P. 1030–1038.
- Kerns J.M., Walter J.S., Patetta M.J. et al.* Histological assessment of wallerian degeneration of the rat tibial nerve following crush and transection injuries // *J. Reconstr. Microsurg.* 2021. V. 37. № 5. P. 391–404.
- Kubiak C.A., Grochmal J., Kung T.A. et al.* Stem-cell-based therapies to enhance peripheral nerve regeneration // *Muscle Nerve*. 2020. V. 61. № 4. P. 449–459. <https://doi.org/10.1002/mus.26760>
- Kuroda Y., Kitada M., Wakao S. et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations // *PNAS USA*. 2010. V. 107. № 19. P. 8639–8643.
- Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Dezawa M.* Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2011. V. 59. № 5. P. 369–378.
- Kuroda Y., Wakao S., Kitada M. et al.* Isolation, culture and evaluation of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 7. P. 1391–1415.

- Lavorato A., Raimondo S., Boido M. et al. Mesenchymal stem cell treatment perspectives in peripheral nerve regeneration: systematic review // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 2. P. 572.
<https://doi.org/10.3390/ijms22020572>
- Lee H.L., Oh J., Yun Y. et al. Vascular endothelial growth factor-expressing neural stem cell for the treatment of neuropathic pain // *Neuroreport.* 2015. V. 26. № 7. P. 399–404.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000359>
- Lee H.L., Lee H.Y., Yun Y. et al. Hypoxia-specific, VEGF-expressing neural stem cell therapy for safe and effective treatment of neuropathic pain // *J. Control. Release.* 2016. V. 226. P. 21–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.047>
- Lovati A.B., D'Arrigo D., Odella S. et al. Nerve repair using decellularized nerve grafts in rat models. A review of the literature // *Front. Cell. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 427.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00427>
- Lu W., Li J.P., Jiang Z.D. et al. Effects of targeted muscle reinnervation on spinal cord motor neurons in rats following tibial nerve transection // *Neural Regen. Res.* 2022. V. 17. № 8. P. 1827–1832.
- Masgutov R., Masgutova G., Mullakhmetova A. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells applied in fibrin glue stimulate peripheral nerve regeneration // *Front. Med. (Lausanne).* 2019. V. 6. P. 68.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00068>
- Mathot F., Shin A.Y., van Wijnen A.J. Targeted stimulation of MSCs in peripheral nerve repair // *Gene.* 2019. V. 710. P. 17–23.
- McGonigal R., Campbell C.I., Barrie J.A. et al. Schwann cell nodal membrane disruption triggers bystander axonal degeneration in a Guillain-Barré syndrome mouse model // *J. Clin. Invest.* 2022. V. 132 (14). P. e158524.
<https://doi.org/10.1172/JCI158524>
- Mukhamedshina Y., Shulman I., Ogurcov S. et al. Mesenchymal stem cell therapy for spinal cord contusion: a comparative study on small and large animal models // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 12. P. 811.
<https://doi.org/10.3390/biom9120811>
- Mietto D.S., Kroner A., Girolami E.I. et al. Role of IL-10 in resolution of inflammation and functional recovery after peripheral nerve injury // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 50. P. 16431–16442.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2119-15.2015>
- Morrison T.J., Jackson M.V., Cunningham E.K. et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2017. V. 196. № 10. P. 1275–1286.
- Murray L.M.A., Krasnodembskaya A.D. Concise review: intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells // *Stem Cells.* 2019. V. 37. № 1. P. 14–25.
<https://doi.org/10.1002/stem.2922>
- Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines // *Immunity.* 2014. V. 41. P. 14–20.
- Namestnikova D.D., Cherkashova E.A., Sukhinich K.K. et al. Combined cell therapy in the treatment of neurological disorders // *Biomedicines.* 2020. T. 8. № 12. P. 613.
- Niemi J.P., Lindborg J.A., Zigmund R.E. Detection of neutrophils in the sciatic nerve following peripheral nerve injury // *Meth. Mol. Biol.* 2020. № 2143. P. 207–222.
- Oh J.S., An S.S., Gwak S.J. et al. Hypoxia-specific VEGF-expressing neural stem cells in spinal cord injury model // *Neuroreport.* 2012. V. 23. № 3. P. 174–178.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32834f4f3a>
- Pan J., Zhao M., Yi X. et al. Acellular nerve grafts supplemented with induced pluripotent stem cell-derived exosomes promote peripheral nerve reconstruction and motor function recovery // *Bioact. Mater.* 2021. V. 15. P. 272–287.
- Parker B.J., Rhodes D.I., O'Brien C.M. et al. Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: a commercial perspective // *Acta Biomater.* 2021. V. 135. P. 64–86.
- Payushina O.V., Tsomartova D.A., Cheresheva E.V. et al. Menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells as a resource for regenerative medicine // *Biol. Bull. Rev.* 2022. V. 12. P. 41–48.
<https://doi.org/10.1134/S2079086422010054>
- Petrova E.S. Differentiation potential of mesenchymal stem cells and stimulation of nerve regeneration // *Rus. J. Dev. Biol.* 2018. V. 49. № 4. P. 193–205.
- Petrova E.S., Kolos E.A. Nerve fiber regeneration in the rat sciatic nerve after injury and administration of mesenchymal stem cells // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2021. V. 51. № 4. P. 513–518.
- Petrova E.S., Chumasov E.I., Otellin V.A. Morphological assessment of growth capacity of the central nervous system axons in a peripheral nerve // *Bull. Exp. Biol. Med.* 1998. V. 125. № 2. C. 205–208.
- Petrova E., Isaeva E., Kolos E., Korzhevskii D. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in the epineurium and perineurium of the recipient rat // *Biol. Commun.* 2018a. V. 63. № 2. P. 123–132.
- Petrova E., Isaeva E., Kolos E., Korzhevskii D. Vascularization of the damaged nerve under the effect of experimental cell therapy // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018b. V. 165. № 1. P. 161–165.
- Petrova E., Kolos E., Korzhevskii D. Changes in the thickness of rat nerve sheaths after single subperineural administration of rat bone marrow mesenchymal stem cells // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021. V. 171. № 4. P. 547–552.
- Ramon y Cahal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. V. 1–2. L.: Oxford Univ. Press, Humphrey Milford, 1928. 769 p.
- Resch A., Wolf S., Mann A. et al. Co-culturing human adipose derived stem cells and Schwann cells on spider silk – a new approach as prerequisite for enhanced nerve regeneration // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 20. P. 71.
- Rosell A., Neukomm L.J. Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in disease // *Open Biol.* 2019. V. 9. P. 190118.
<https://doi.org/10.1098/rsob.190118>
- Sanagi T., Yabe T., Yamada H. Gene transfer of PEDF attenuates ischemic brain damage in the rat middle cerebral artery occlusion model // *J. Neurochem.* 2008. V. 106 (4). P. 1841–1854.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05529.x>
- Sarker M., Saman N., McInnes A.D. et al. Regeneration of peripheral nerves by nerve guidance conduits: influence of design, biopolymers, cells, growth factors, and physical stimuli // *Prog. Neurobiol.* 2018. V. 171. P. 125–150.
- Sekiguchi H., Ii M., Jujo K. et al. Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve // *Angiogenesis.* 2013. V. 16. № 1. P. 45–58.
<https://doi.org/10.1007/s10456-012-9298-5>

- Siemionow M., Brzezicki G.* Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair // *Int. Rev. Neurobiol.* 2009. V. 87. P. 141–172.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)87008-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87008-6)
- Siemionow M., Strojny M.M., Kozłowska K. et al.* Application of human epineural conduit supported with human mesenchymal stem cells as a novel therapy for enhancement of nerve gap regeneration // *Stem Cell Rev. Rep.* 2022. V. 18. № 2. P. 642–659.
<https://doi.org/10.1007/s12015-021-10301-z>
- Stratton J.A., Shah P.T.* Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role? // *Neural Regen. Res.* 2016. V. 11. № 1. P. 53–57.
- Sukhinich K.K., Dashinimaev E.B., Vorotelyak E.A., Aleksandrova M.A.* Regenerative effects and development patterns of solid neural tissue grafts located in gelatin hydrogel conduit for treatment of peripheral nerve injury // *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* 2020a. T. 8. № 2. P. e2610.
<https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000002610>
- Sukhinich K.K., Namestnikova D.D., Gubskii I.L. et al.* Distribution and migration of human placental mesenchymal stromal cells in the brain of healthy rats after stereotaxic or intra-arterial transplantation // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020b. V. 168. № 4. P. 542–551.
- Sunderland S.* The anatomy and physiology of nerve injury // *Muscle Nerve.* 1990. V. 13. № 9. P. 771–784.
<https://doi.org/10.1002/mus.880130903>
- Takeuchi S., Tsuchiya A., Iwasawa T. et al.* Small extracellular vesicles derived from interferon- γ pre-conditioned mesenchymal stromal cells effectively treat liver fibrosis // *NPJ Regen. Med.* 2021. V. 6. № 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1038/s41536-021-00132-4>
- Thomas C.K., Erb D.E., Grumbles R.M., Bunge R.P.* Embryonic cord transplants in peripheral nerve restore skeletal muscle function // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 84. № 1. P. 591–595.
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.1.591>
- Tricaud N., Park H.T.* Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm // *Cell. Mol. Life Sci.* 2017. V. 74. № 22. P. 4049–4057.
- Valentini R.F., Sabatini A.M., Dario P., Aebischer P.* Polymer electret guidance channels enhance peripheral nerve regeneration in mice // *Brain Res.* 1989. V. 480 (1–2). P. 300–304.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90196-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90196-0)
- Waller A.* New method for the study of the nervous system // *Lond. J. Med.* 1852. V. 4. № 43. P. 609–625.
- Wang C., Lu C.F., Peng J. et al.* Roles of neural stem cells in the repair of peripheral nerve injury // *Neural Regen. Res.* 2017. V. 12. P. 2106–2112.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.221171>
- Weiss D.J., English K., Krasnodembskaya A. et al.* The necrobiology of mesenchymal stromal cells affects therapeutic efficacy // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1228.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01228>
- Wong K.M., Babetto E., Beirowski B.* Axon degeneration: make the Schwann cell great again // *Neural Regen. Res.* 2017. V. 12. № 4. P. 518–524.
- Xin D., Li T., Chu X. et al.* Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles modulate microglia/macrophage polarization and protect the brain against hypoxia-ischemic injury in neonatal mice by targeting delivery of miR-21a-5p // *Acta Biomater.* 2020. V. 113. P. 597–613.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.037>
- Xu Q., Zhang M., Liu J., Li W.* Intrathecal transplantation of neural stem cells appears to alleviate neuropathic pain in rats through release of GDNF // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2013. V. 43. P. 154–162.
- Yamada Y., Minatoguchi S., Baba S. et al.* Human Muse cells reduce myocardial infarct size and improve cardiac function without causing arrhythmias in a swine model of acute myocardial infarction // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 3. P. e0265347.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265347>
- Yarygin K.N., Lupatov A.Y., Sukhikh G.T.* Modulation of immune responses by mesenchymal stromal cells // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 161. № 4. P. 561–565.
- Zigmond R.E., Echevarria F.D.* Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury // *Prog. Neurobiol.* 2019. V. 173. P. 102–121.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.001>

Cell Technologies in Experimental Therapy of Nerve Injuries (Analytical Review)

E. S. Petrova*

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

*e-mail: iempes@yandex.ru

This review is devoted to the actual problem of the damaged nerves repair using stem cells. An analysis of our own data and literature data on the development of mesenchymal and neural stem cells under conditions of an altered microenvironment during transplantation into an injured nerve of laboratory animals is presented in this work. A comparison of the regenerative potencies of transplanted cells and an assessment of their effect on reparative processes in the recipient's nerve were carried out. The revealed differences in the effect of stem cells of different origin on the regenerating nerve suggested that cell therapy affects the processes of Wallerian degeneration on the early stages after nerve injury. It has been concluded about the need for extensive fundamental research on the molecular regulation of Wallerian degeneration processes and its changes under the influence of exogenous stem cells.

Keywords: nerve regeneration, neural stem/progenitor cells, mesenchymal stem cells, transplantation

УДК 612.115.3

КОМПОЗИТ ХИТОЗАНА С АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТОЙ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2022 г. Л. А. Ляпина¹, *, М. Е. Григорьева¹, Т. Ю. Оберган¹, Т. А. Шубина¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

*e-mail: lyapinal@mail.ru

Поступила в редакцию 18.04.2022 г.

После доработки 14.05.2022 г.

Принята к публикации 14.05.2022 г.

Созданы композиты хитозана с аспарагиновой кислотой при разных весовых соотношениях компонентов и изучено их влияние на состояние первичного и плазменного гемостаза в условиях *in vitro* с целью выявления наиболее перспективного из них. Эксперименты также проведены на здоровых животных при многократном в течение 14 сут ежедневном пероральном введении выявленного *in vitro* коагулянтного композита хитозан–аспарагиновая кислота в дозе 102 мкг/кг массы тела крыс. Установлено, что через 20 ч после последнего введения композита и его составных частей в эквивалентном количестве параметры первичного (уровень агрегации тромбоцитов) и плазменного (активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время, протромбиновое время, фибринолиз, уровень фактора XIIIa, концентрация фибриногена, процесс полимеризации фибрина) гемостаза свидетельствовали о повышении свертываемости крови и предупреждении геморрагических осложнений в организме крыс. Делается вывод о перспективности изучения хитозана и его композита с аспарагиновой кислотой в условиях патологически сниженной свертываемости крови с последующим их внедрением в клиническую практику.

Ключевые слова: хитозан, композит хитозан–аспарагиновая кислота, система гемостаза

DOI: 10.31857/S0042132422060059

ВВЕДЕНИЕ

Применение фармакологических препаратов на основе аминокислот – общепринятая практика, используемая на протяжении последних десятилетий специалистами различных направлений. Известно, что аминокислоты выполняют роль нейромедиаторов, способствуют адекватной реализации функций макро- и микроэлементов, а также витаминов. Современные данные свидетельствуют о том, что биосинтез заменимых кислот в количествах, полностью обеспечивающих потребности организма, невозможен.

Одна из заменимых аминокислот – аспарагиновая кислота – синтезируется в организме из аспарагина. Она входит в состав животных и растительных белков, относится к эндогенным биоспецифическим соединениям, содержащимся в ЦНС, особенно в головном мозге, и не считается острой токсичной после перорального воздействия даже в большой дозе – 2 г/кг (Стручкова, Брилкина, 2016; Delaney et al., 2008). Аспарагиновая кислота обладает иммуномодулирующим действием – ускоряет процесс образования иммуноглобулинов и антител; участвует в синтезе ДНК и РНК – основных носителей генетической информации;

повышает физическую выносливость; нормализует баланс возбуждения и торможения в ЦНС. Она выполняет важнейшую роль в различных метаболических реакциях и способствует трансформации углеводов в глюкозу с последующим созданием запасов гликогена, в результате чего повышается сопротивляемость организма усталости (Лысыков, 2012). Аспарагиновая кислота входит в состав гемостатического гидрогеля, включающего полиаспарагиновую кислоту (polyaspartic acid, PASA) и дополнительно неорганический полифосфат и диальдегид. Этот гидрогель показал биосовместимость и адгезию к эндотелию тканей с высокими коагулянтными характеристиками. Так, на артерии уха кролика, используемой в качестве модели гемостаза *in vivo*, продемонстрировано, что гидрогель PASA может остановить кровотечение травматической раны и значительно уменьшить кровопотерю. В целом гидрогели PASA демонстрируют большой потенциал в биомедицинском применении, особенно в раневых перевязочных материалах и в восстановлении тканей (Chen et al., 2022).

Получены биоматериалы из биоактивных гемостатических средств, включающих не только аспарагиновую кислоту, но и хитозан. Они имеют отличные коагулянтные свойства при контакте с

кровью человека благодаря активации тромбоцитов, подтвержденной тестами на свертываемость крови и микрофотографиями, показавшими прилипание клеток крови к поверхности биоматериалов. Кроме того, эти биоматериалы биосовместимы с дермальными фибробластами человека и обладают превосходными антибактериальными свойствами при борьбе как с золотистым стафилококком *Staphylococcus aureus*, так и с кишечной палочкой *Escherichia coli*. Материалы на основе хитозана с гемостатическими свойствами обладают большим потенциалом при применении как в стерильных, так и в загрязненных условиях (Radwan-Pragłowska et al., 2019), поскольку известно, что замедленная коагуляция, хроническое воспаление, бактериальная инфекция и медленная пролиферация клеток препятствуют эффективному ранозаживлению.

Хитозан – это полисахарид, полученный из хитина, который обладает отличными ранозаживляющими свойствами, сочетающимися с антимикробной и гемостатической активностью. По сравнению с обычной марлевой повязкой, хитозановая повязка влияет на первичный (возрастание агрегации тромбоцитов) и плазменный гемостаз (ускорение протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени). Хитозановая повязка ингибирует рост бактерий до 8 дней после операции и является эффективным антимикробным и прокоагулянтным средством, способствуя заживлению ран и обеспечивая подходящую среду для полезной микробиоты (Wang et al., 2021). Хитозан – один из наиболее исследованных биополимеров, он активно применяется для ранозаживления благодаря своей биосовместимости, биоразлагаемости, нетоксичности и антимикробной активности. Кроме того, хитозан и его производные привлекают большое внимание из-за его легкой перерабатываемости в различные формы (гели, пены, мембраны и шарики) и способности доставки лекарств/генов к месту назначения. Все эти свойства делают материалы на основе хитозана особенно универсальными и перспективными в применении для раневых повязок (Moeini et al., 2020; Ilyas et al., 2022).

Хитозан, введенный *in vivo*, контактирует с кровью, взаимодействуя с ее компонентами, что имеет решающее значение для определения эффективности и безопасности полимера. Изучено влияние хитозана с различной молекулярной массой на структуру и функцию свертывающих белков. Показано, что хитозан и фибриноген могут образовывать комплексы главным образом за счет электростатического притяжения, в результате чего изменяется структура и конформация фибриногена (Луговской и др., 2013). Однако не выявлено значительного влияния хитозана на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). При этом изменения параметров тромбо-

эластограммы демонстрируют нарушение процесса свертывания крови. Эти результаты дают важное представление о молекулярной основе биологического ответа организма на хитозан и другие биополимеры (Zhang et al., 2013).

Олигосахарид хитозана (chitosan oligosaccharide, COS) известен своей уникальной биологической активностью: противоопухолевой, противовоспалительной, антиоксидантной, антибактериальной, иммуностимулирующей. Научный интерес к COS определяется возможностью его использования при производстве лекарств, продуктов питания, косметики, биоматериалов и в тканевой инженерии. По сравнению с соответствующим полимером, COS имеет гораздо более высокие профили абсорбции на кишечном уровне, что обуславливает быстрый доступ к кровотоку и потенциальный контакт с компонентами крови. Он в определенной мере понижает риск гемолиза в зависимости от дозы и молекулярной массы, а необратимая агрегация тромбоцитов наблюдается при его высокой концентрации (Guo et al., 2018). Однако детальное влияние хитозана на компоненты крови до сих пор остается недостаточно ясным.

Цель настоящей работы – получить наиболее эффективный по коагулянтным свойствам композит хитозана с аспарагиновой кислотой, изучить его всестороннее влияние на систему гемостаза, включая первичный и плазменный гемостаз, а также выявить его роль в балансе фибринолиза и полимеризации фибрина в условиях *in vitro* и *in vivo* при пероральном многократном введении животным (крысам).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован хитозан водорастворимый (сукцинил хитозана), полученный по запатентованной методике из панцирей красноногих крабов в соответствии с ТУ 9284-027-11734126-08 (“Биопрогресс”, Россия), и аспарагиновая кислота отечественного производства. В опытах *in vitro* готовили композиты, включающие исходно 5000 мкг хитозана (ХТЗ) и 100 мкг аспарагиновой кислоты (АК) (композит 1), а далее готовили различные разведения композитов, а именно: композит 2 включал 1000 мкг ХТЗ + 20 мкг АК/мл, композит 3 – 100 мкг ХТЗ + 2 мкг АК/мл. ХТЗ и АК инкубировали при 37°C в течение не менее 2 мин.

В экспериментах, проведенных с соблюдением этических правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006), использовано 50 крыс-самцов Wistar массой тела 250–280 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь – 12 ч/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26°C, относительная влажность 50–70%). Для исследования

Таблица 1. Изменение показателей прокоагулянтной активности и фибринолиза при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан–аспарагиновая кислота или его составных частей

Условия опыта	АЧТВ, %	ТВ, %	ПВ, %	СФА, %	НФ, %
Композит 1	86 ± 7.0*	100 ± 0.3	71 ± 5.2**	64.5 ± 3.8**	72 ± 2.3**
Композит 2	87 ± 5.7*	100 ± 0.5	75 ± 4.4**	68 ± 3.0**	75 ± 3.2**
Композит 3	75 ± 2.7**	100 ± 0.5	81 ± 4.4*	70 ± 2.8**	72 ± 2.8**
АК 1	70 ± 3.6**	107 ± 0.5	86 ± 5.9	97 ± 4.1	81 ± 4.0**
АК 2	68 ± 3.0**	101 ± 0.5	93 ± 11.1	98 ± 4.0	91 ± 3.0
АК 3	78 ± 4.0*	100 ± 1.1	94 ± 6.7	98 ± 4.0	91 ± 3.5
ХТЗ 1	91 ± 4.2	94 ± 0.3	76 ± 2.7**	83 ± 4.0**	72 ± 3.7**
ХТЗ 2	90 ± 4.8	98 ± 0.3	77 ± 2.4**	81 ± 4.7**	72 ± 3.7**
ХТЗ 3	91 ± 5.0	95 ± 0.5	80 ± 2.9**	82 ± 5.9*	86 ± 4.1*
Контроль NaCl	100 ± 5.2	100 ± 0.3	100 ± 2.9	100 ± 3.1	100 ± 2.7

Примечание: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$; статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля с NaCl; здесь и в табл. 2, 3.

использовали здоровых животных. Животные были разделены на четыре группы: в течение 14 сут первой группе (Композит) перорально вводили ХТЗ + АК в ежедневной дозе 102 мкг/кг, второй группе (ХТЗ) подобным образом вводили эквивалентную дозу ХТЗ (100 мкг/кг), третьей группе – АК (2 мкг/кг), четвертой группе (Контроль) – 0.85%-ный раствор NaCl (физиологический раствор) в объеме 0.5 мл на крысу.

Взятие крови производили у животных из яремной вены (*vena jugularis*) с использованием в качестве консерванта 3.8%-го цитрата натрия в соотношении 9 : 1 через 20 ч после 14-го введения исследуемых препаратов. Кровь центрифугировали дважды: сначала – в течение 5 мин при 1000 об./мин для получения богатой тромбоцитами плазмы, а затем – в течение 12 мин при 2500 об./мин для получения бедной тромбоцитами плазмы.

Исследовали суммарную фибринолитическую активность (СФА) и неферментативный фибринолиз (НФ), ферментативный фибринолиз (ФФ), степень полимеризации фибрина (фибринполимеризационную активность), АЧТВ, тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ), концентрацию фибриногена, активность фактора XIIIa (ФХIIIa) в бедной тромбоцитами плазме крови, согласно стандартным методам. Свертываемость крови изучали по тесту АЧТВ, ТВ и ПВ на анализаторе свертывания крови АСКа 2-02-“Астра” (Россия). Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови определяли на агрегометре АЛАТ-2 220LA (“Биола”, Россия) по методу Борна с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации 10^{-6} М (Баркаган, Момот, 2008; Ляпина и др., 2012).

Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., USA). Эмпирические распре-

деления проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для полярного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты in vitro

Проведенное в условиях *in vitro* исследование влияния трех разных композитов ХТЗ–АС показало, что все три, а именно, композит 1 (5000 мкг ХТЗ + 100 мкг АС), композит 2 (1000 мкг ХТЗ + 20 мкг АК) и композит 3 (100 мкг ХТЗ + 2 мкг АК) обладали эффектом, активизирующим свертывание крови, за счет снижения АЧТВ на 13–25%, ПВ – на 19–29% и параметров фибринолиза: СФА – на 30–35.5%, НФ – на 25–28%. Композит 3, где использовались малые концентрации составляющих компонентов, также оказывал значительное воздействие на параметры гемостаза, снижая АЧТВ на 25%, ПВ – на 19%, СФА – на 30%, НФ – на 28%. Из составных частей композитов: ХТЗ значительно снижал фибринолиз крови (на 14–28%), а АК подавляла АЧТВ (на 22–32%), не влияя на другие параметры гемостаза (табл. 1).

Нами также установлено, что *in vitro* композиты эффективно усиливали активность ФХIIIa на 66–72% и полимеризацию фибрина – 30–42%, практически не изменяя концентрацию фибриногена и агрегацию тромбоцитов, по сравнению с контролем. Из составных частей только эквивалентная концентрация ХТЗ в композите 2 достоверно повышала концентрацию фибриногена на 16.6%. При этом ХТЗ в композите 1 достоверно усиливал полимеризацию фибрина и агрегацию тромбоцитов на 17 и 20% соответственно, по срав-

Таблица 2. Изменение показателей гемостаза при добавлении к нормальной плазме крови композита хитозан–аспарагиновая кислота или его составных частей

Условия опыта	Степень полимеризации фибрина, %	Агрегация тромбоцитов, %	Концентрация фибриногена, %	Активность ФХШа, %
Композит 1	135.5 ± 5.2**	113 ± 5.6*	116.6 ± 5.1*	172 ± 8.6**
Композит 2	142 ± 6.7**	93 ± 4.8	108 ± 2.8	166 ± 7.8**
Композит 3	130 ± 3.3**	93 ± 4.5	110 ± 3.0	166 ± 8.4**
АК 1	103 ± 1.9	80 ± 7.0	112.5 ± 3.1*	110 ± 6.5
АК 2	102 ± 1.9	87 ± 6.9	112.5 ± 2.8*	97 ± 4.8
АК 3	102 ± 1.8	87 ± 7.2	108 ± 3.3	103 ± 4.9
ХТЗ 1	117 ± 2.3**	120 ± 6.5**	100 ± 3.5	138 ± 7.4*
ХТЗ 2	109 ± 2.8	107 ± 5.7	116.6 ± 3.4**	131 ± 6.6*
ХТЗ 3	108 ± 2.8	93 ± 5.0	100 ± 4.2	110 ± 7.7*
Контроль NaCl	100 ± 3.0	100 ± 5.8	100 ± 4.5	100 ± 4.9

нению с контролем. Кроме того, ХТЗ в эквивалентных по отношению к соответствующим композициям концентрациях повышал активность ФХШа.

На основании проведенных в условиях *in vitro* экспериментов выявлено, что композит, включающий минимальное количество ХТЗ и АК (композиция 3), обладает способностью повышать свертывание крови по всем тестам, а именно: АЧТВ, ПВ, активность ФХШа, при одновременном снижении СФА и НФ и повышении полимеризации фибрина (табл. 2).

Эксперименты *in vivo*

С композитом 3 далее проводили эксперименты на здоровых крысах, которым длительное время (в течение 14 сут) его вводили безопасным способом (перорально).

В этих условиях через 20 ч после последнего 14-го введения композита 3 установлено блокирующее действие на фибринолитический процесс (СФА снизилась на 28%, НФ – на 16%, ФФ – на 49%). Кроме того, композит снижал ПВ и АЧТВ на 27 и 18% соответственно при одновременном повышении активности ФХШа и агрегации тромбоцитов на 60 и 23% соответственно, по сравнению с контролем, при практически неизменном ТВ. Обращает на себя внимания факт значительного снижения ФФ, что указывает на преимущественный вклад именно ФФ в подавление СФА, что требует дальнейшего детального исследования этого процесса. Следует отметить, что активность ФХШа резко усиливается, что свидетельствует о способности данного композита участвовать в активации полимеризации фибрина (табл. 3).

Из составных частей коагулянтного композита 3 только ХТЗ снижает АЧТВ на 24% и ПВ – на 20%, а также показатели фибринолиза: СФА и НФ – на 12%, ФФ – на 26%. При этом наблюдается достоверное повышение агрегации тромбоцитов в 2 раза.

АК в чистом виде имеет только тенденцию к повышению активности ФХШа на 11%.

Таким образом, анализируя полученные данные, необходимо отметить, что при исследовании гемостазиологических эффектов трех композиций, мы остановили свой выбор на композите 3, так как, во-первых, в нем содержались наименьшие концентрации веществ, вызывающих коагулянтные эффекты в кровотоке; во-вторых, он оказывал наиболее выраженное действие на АЧТВ, по сравнению с другими композициями. Механизм гемостатического действия композита обусловлен не только присутствием в нем коагулянта хитозана, но и способствующей свертыванию крови аспарагиновой кислоты. В то же время можно заключить, что обнаруженные нами прокоагулянтные эффекты обусловлены в основном действием самого композита, включающего хитозан и аспарагиновую кислоту в определенном соотношении. До сих пор остро стоит проблема борьбы с массивной кровопотерей, являющейся причиной многочисленной смертности от кровоизлияния, которое может произойти как в бытовых условиях, так и во время операции, а также в боевых условиях. Коммерчески доступных биоматериалов может быть недостаточно для борьбы с чрезмерным кровотечением, поэтому пытаются создать разработки новых высокоэффективных комплексных гемостатических агентов (Radwan-Pragłowska et al., 2019). Полученные в настоящем исследовании результаты по изучению созданных нами композиций хитозана с аспарагиновой кислотой показали наличие у них повышенных гемостатических свойств. Результаты ряда исследований (Chou et al., 2003) показали, что хитозан усиливает адгезию и агрегацию тромбоцитов: после начального (в течение 5 мин) и длительного (в течение 30 мин) контакта тромбоцитов с хитозаном адгезия тромбоцитов дозозависимо повышается. Аналогично, хитозан также дозозависимо увеличивает агрегацию тромбоцитов и количество внутри-

Таблица 3. Изменение показателей гемостаза в плазме крови через 20 ч после 14-кратного перорального введения здоровым крысам композита хитозан–аспарагиновая кислота или его составных частей

Показатели	Условия опыта			
	контроль NaCl	композит 102 мкг/кг	ХТЗ 100 мкг/кг	АК 2 мкг/кг
СФА, %	100 ± 3.8	72 ± 1.5**	88 ± 3.8*	91 ± 2.1
НФ, %	100 ± 5.5	84 ± 4.5*	88 ± 3.5*	93 ± 5.0
ФФ, %	100 ± 5.3	51 ± 3.8**	74 ± 7.6*	95 ± 3.8
ПВ, %	100 ± 6.5	73 ± 3.0**	80 ± 2.9**	98 ± 5.0
ТВ, %	100 ± 7.6	98 ± 0.8	92 ± 3.4	101 ± 3.5
АЧТВ, %	100 ± 6.4	82 ± 5.1*	76 ± 1.5**	85 ± 5.4*
АТ, %	100 ± 7.6	123 ± 6.7**	212 ± 7.5**	92 ± 7.2
ФХШа, %	100 ± 3.1	160 ± 7.3**	112 ± 3.5*	111 ± 3.2*

клеточного свободного Ca^{2+} . Кроме того, хитозан значительно усиливает экспрессию комплекса гликопротеина Пв/Ша тромбоцитов. По данным авторов, хитозан – эффективный индуктор адгезии и агрегации тромбоцитов. Механизмы его действия могут быть обусловлены как повышением уровня Ca^{2+} , мобилизацией и усилением экспрессии комплекса гликопротеина Пв/Ша на поверхностях мембран тромбоцитов (Кузник, 2010; Periyah et al., 2014), так и высвобождением факторов роста из активированных тромбоцитов (Shen et al., 2006). В настоящее время создаются перспективные композиционные материалы на основе хитозана для применения в качестве гемостатических и ранозаживляющих средств (Zhang et al., 2013; Nu et al., 2018).

В наших исследованиях в условиях *in vitro* повышение агрегации тромбоцитов установлено только при высоких концентрациях хитозана (более 5 мг/мл), то есть отмечается дозозависимость действия и самого хитозана, и включающих его композитов.

В условиях *in vivo* при многократном поступлении в организм хитозана и/или включающего его композита также показано усиление агрегационной активности крови в зависимости от используемых доз.

Впервые в нашей работе проведено комплексное исследование изменений показателей всех звеньев системы гемостаза, в том числе и плазменного, под влиянием не только хитозана, но и композитов хитозана с аспарагиновой кислотой. Установлено, что параметры плазменного гемостаза дозозависимо изменяются в сторону активации свертывания крови. Дополнительно к этому, преимущество созданных нами композитов является то, что их можно применять атравматичным безопасным способом для получения выраженного коагулянтного эффекта, что и было продемонстрировано в настоящей работе. Хотя хитозан также относится к гемостатическим агентам, но, по сравнению с исследуемыми нами компо-

зитами (особенно композитом, содержащим минимальное количество хитозана и аспарагиновой кислоты) его эффекты значительно ниже.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на потенциальные возможности препаратов на основе коагулянта хитозана влиять на гемостазиологический статус организма, особенно в условиях пониженной свертываемости крови с признаками геморрагии. Созданные нами композиты хитозана с аспарагиновой кислотой обладают комплексным действием на первичный и плазменный гемостаз. При многократном пероральном поступлении композитов хитозан–аспарагиновая кислота в организм выявлены максимальные свертывающие эффекты у композита с минимальным включением хитозана и аспарагиновой кислоты (композит 3). При этом показано наличие у него свертывающих, фибринстабилизирующих, тромбоцитарных, антифибринолитических эффектов и способности к полимеризации фибрина. Композиционный материал хитозан–аспарагиновая кислота заслуживает особого внимания, так как он безопасен при атравматичном способе применения. Он также способен оказать мягкий антигеморрагический эффект в случаях снижения свертываемости крови, подавления агрегации тромбоцитов или интенсификации фибринолиза. Несомненно, композиты на основе хитозана могут быть отнесены к перспективным средствам для восстановления показателей гемостаза в условиях пониженной свертываемости крови.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008. 292 с.
- Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
- Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев: Наукова Думка, 2013. 230 с.
- Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека // Экспер. клин. гастроэнтерол. 2012. № 2. С. 88–105.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
- Стручкова И.В., Брилкина А.А. Аминокислоты. Учебно-методическое пособие. Н. Новгород: ННГУ, 2016. 32 с.
- Chen D., Liu X., Qi Y. et al. Poly(aspartic acid) based self-healing hydrogel with blood coagulation characteristic for rapid hemostasis and wound healing applications // Coll. Surf. B Biointerfaces. 2022. V. 214. P. 112430. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112430>
- Chou Tz.-C., Fu E., Wu C.-J., Yeh J.-H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 302. № 3. P. 480–483. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00173-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00173-6)
- Delaney B., Shen Z.A., Powley C.R. et al. Acute and repeated dose oral toxicity of N-acetyl-L-aspartic acid in Sprague-Dawley rats // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. № 6. P. 2023–2034. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.042>
- Guo X., Sun T., Zhong R. et al. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1412. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01412>
- Hu Z., Zhang D.Y., Lu S.T. et al. Chitosan-based composite materials for prospective hemostatic applications // Mar. Drugs. 2018. V. 16. № 8. P. 273. <https://doi.org/10.3390/md16080273>
- Piyas R.A., Aisyah H.A., Nordin A.H. et al. Natural-fiber-reinforced chitosan, chitosan blends and their nanocomposites for various advanced applications // Polymers. 2022. V. 14. № 5. Iss. 874. P. 1–36. <https://doi.org/10.3390/polym14050874>
- Moeini A., Pedram P., Makvandi P. et al. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: a review // Carbohydr. Polym. 2020. V. 233. P. 115839. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839>
- Periayah M.H., Halim A.S., Yaacob N.S. et al. Glycoprotein IIb/IIIa and P2Y12 induction by oligochitosan accelerates platelet aggregation // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. P. 653149. <https://doi.org/10.1155/2014/653149>
- Radwan-Pragłowska J., Piątkowski M., Deineka V. et al. Chitosan-based bioactive hemostatic agents with antibacterial properties-synthesis and characterization // Molecules. 2019. V. 24. № 14. P. 2629. <https://doi.org/10.3390/molecules24142629>
- Shen E.C., Chou T.C., Gau C.H. et al. Releasing growth factors from activated human platelets after chitosan stimulation: a possible biomaterial for platelet-rich plasma preparation // Clin. Oral Implants Res. 2006. V. 17. № 5. P. 572–578. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01241.x>
- Wang C.H., Cherng J.H., Liu C.C. et al. Procoagulant and antimicrobial effects of chitosan in wound healing // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 13. P. 7067. <https://doi.org/10.3390/ijms22137067>
- Zhang W., Zhong D., Liu Q. et al. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 2013. V. 24. № 13. P. 1549–1563. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.777229>

Chitosan Composite with Aspartic Acid and Its Effect on Blood Coagulation *in vitro* and *in vivo*

L. A. Lyapina^a, *, M. E. Grigorjeva^a, T. Y. Obergan^a, and T. A. Shubina^a

^aLomonosov Moscow State University, Biology Department, Moscow, Russia

*e-mail: lyapinal@mail.ru

Composites of chitosan with aspartic acid were created at different weight ratios of components and their effect on the state of primary and plasma hemostasis *in vitro* was studied in order to identify the most promising of them. Experiments were also carried out on healthy animals with repeated daily oral administration of the detected *in vitro* coagulant composite chitosan-aspartic acid at a dose of 102 mcg/kg of rat body weight for 14 days. It was found that 20 h after the last administration of the composite and its components in an equivalent amount, the parameters of primary (platelet aggregation level) and plasma (activated partial thromboplastin time, thrombin time, prothrombin time, fibrinolysis, factor XIIIa level, fibrinogen concentration, fibrin polymerization process) haemostasis indicated an increase in blood coagulation and prevention of hemorrhagic complications in the rats organism. The conclusion is made about the prospects of studying chitosan and its composite with aspartic acid in conditions of pathologically reduced blood coagulation with their subsequent introduction into clinical practice.

Keywords: chitosan, chitosan–aspartic acid composite, haemostasis system

УДК 616.9-08

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ТРАДИЦИОННОГО КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ И ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© 2022 г. В. М. Земсков¹ *, А. М. Земсков², А. А. Барсуков¹,
М. Н. Козлова¹, В. А. Земскова², Н. С. Шишкина¹, В. С. Демидова¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А.В. Вишневского, Москва, Россия

²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

*e-mail: arturrego@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2022 г.

После доработки 06.06.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Использованы инновационные технологии для интегральной сопоставительной оценки результатов традиционного обследования больных с отдельными нозоформами неспецифических воспалительных заболеваний легких (НВЗЛ) и гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ). Исследованы изменения клинко-лабораторного статуса в целом, установлено повышение общей эффективности лечения за счет нуклеината натрия и галавита, определены “собственные” эффекты модуляторов, независимые от традиционной терапии. С помощью современных методов у пациентов оценены типовые гематологические, иммунные, бактериологические и клинические параметры.

Ключевые слова: неспецифические воспалительные заболевания легких, гнойно-воспалительные заболевания, нуклеинат натрия, галавит

DOI: 10.31857/S0042132422060114

ВВЕДЕНИЕ

Очередной виток развития клинической иммунологии от изучения антиинфекционной резистентности до “новой” иммунологии и клинической иммунологии в современном понимании (Петров, 1987; Медицинская..., 2012; Хаитов и др., 2010) привел к формулированию ряда утверждений этой медико-биологической дисциплины, к которым относятся постулаты: об индукции иммунных расстройств при широком спектре заболеваний; о необходимости их коррекции для достижения выздоровления или ремиссии; о наличии стабильных мишеней действия у модулирующих препаратов (Земсков и др., 1999; Новиков, Новиков, 2009; Иммунотерапия, 2011; Энциклопедия иммунологии, 2013). Однако в последние годы появились некоторые феномены, не вписывающиеся в классические представления клинических иммунологов.

Традиционное клинко-лабораторное обследование пациентов позволяет не только сопоставить результаты при различных заболеваниях, но также отследить в ходе терапии изменения обще-

го статуса; удостовериться в повышении эффективности лечения за счет применения модуляторов нуклеината натрия и галавита; определить собственный эффект модуляторов, независимый от традиционных схем лечения.

В качестве клинических моделей были избраны:

1) неспецифические воспалительные заболевания легких (НВЗЛ): смешанная (сБА), экзогенная (экБА), эндогенная (энБА) бронхиальная астма;

2) хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ);

3) сБА + ХОБЛ и сБА + аллергический дерматит (АД);

4) гнойно-воспалительные заболевания (ГВЗ): глубокая пиодермия (ГП), обострение хронического пиелонефрита (ОХПН), обострение хронического сальпингоофорита (ОХСО), гнойная инфекция мягких тканей (ГИМТ), ГИМТ + АД и ГИМТ + истинная экзема (ИЭ).

Клинический диагноз заболеваний верифицирован согласно существующим стандартам. Результаты обследования 30 здоровых лиц служили референсными данными.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось более 400 больных, страдающих выше приведенными заболеваниями, разделенных на 24 группы, репрезентативные по количеству, рандомизированные по полу, возрасту, тяжести болезни и др., по 17–19 человек в каждой, получающих традиционное лечение или его комбинацию с модуляторами, при НВЗЛ – с нуклеином натрия (НН), при ГИМТ – с НН, при ГВЗ – с галавитом. До и после комплексной терапии у всех исследуемых пациентов традиционными методами определяли гематологические показатели – уровни лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, СОЭ и др. Содержимое популяций и субпопуляций лимфоцитов и фагоцитарную способность нейтрофилов оценивали на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter); кислородзависимый метаболизм нейтрофилов – с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия, содержание циркулирующих иммунных комплексов – спектрофотометрическим методом, сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G и цитокинов – турбидиметрическим и иммуноферментным методами. При НВЗЛ и ГВЗ также учитывали (дифференцированные для каждой нозоформы) клинические, а у страдающих ГИМТ еще и бактериологические параметры по высеваемости микрофлоры из диагностического материала.

Достоверность отличий отдельных параметров клинико-лабораторного статуса от заданного уровня определяли с использованием статистических критериев Стьюдента или Уилкоксона–Манна–Уитни. Интегральную оценку вариаций показателей в целом осуществляли ранговым методом с учетом количества критично измененных показателей у больных в группе по следующей шкале: 0–33% – несущественные недостоверные отличия (3 ранг), 34–66% – средние достоверные (2 ранг), >66% – значительные достоверные (1 ранг) с трактовкой: чем меньше сумма рангов, тем выше отличия. Для оценки собственного клинико-лабораторного эффекта вариантов терапии, независимого от традиционного лечения, использовали ФМИсоб (формула собственного эффекта модулятора иммунитета):

$$\left(\frac{P_{UC} - P_T}{P_{UC}} \right) \left(\frac{P_{UC} - P_M}{P_{UC}} \right) \times 100,$$

где P_{UC} – значение параметра в абсолютных величинах до начала лечения, P_T – то же после традиционной терапии, P_M – то же после традиционного лечения в сочетании с иммуномодулятором с аналогичной трактовкой результатов.

Коэффициент диагностической ценности (K_j) определяется по формуле (Горелик, Скрипкин, 1977):

$$K_j = \frac{2(\delta_1^2 + \delta_2^2)}{(M_2 - M_1)^2},$$

где δ_1 и δ_2 – средние квадратичные отклонения, M_1 и M_2 – средние арифметические величины показателей.

K_j позволяет рассчитать формулу расстройств иммунной системы (ФРИС), определяя 3 ключевых параметра по их динамике от уровня нормы и дисперсии с указанием вектора (“+” – повышение, “–” – подавление) и степени (1–2–3) изменений (Земсков и др., 1999; Энциклопедия иммунологии, 2013). Чем меньше величина K_j , тем в большей степени данный показатель отличается от заданного уровня. При выстраивании параметров по порядку, согласно величинам коэффициента диагностической ценности, определяется рейтинг выраженности отличий или эффективности воздействий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе достоверной динамики лабораторных показателей от уровня нормы у пациентов, страдающих шестью видами НВЗЛ, установлены типовые изменения, характерные для всей группы заболеваний и специфические особенности иммунопатологии, привязанные к отдельным нозоформам. Общим в стадии обострения НВЗЛ было снижение уровня Т-лимфоцитов, Т-хелперов, увеличение естественных киллеров (НК-клеток), циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), молекул средней массы (МСМ), провоспалительных ИЛ-6, -8, подавление поглотительной способности фагоцитов, лейкоцитоз, накопление гранулоцитов, моноцитов, сиаловых кислот и гексоз. Вариации остальных параметров оказались разнонаправленными.

В количественном плане наиболее выраженным было изменение гематологических маркеров воспаления при экБА, сБА + ХОБЛ, сБА + АД, а при сБА, энБА, сБА + ХОБЛ, сБА + АД – иммунных показателей. При оценке частоты клинических симптомов заболеваний, которые практически не различались при всех нозоформах НВЗЛ, учитывались: общее самочувствие, приступы удушья, одышка, кашель, хрипы в легких. Каких-либо особенностей у пациентов из разных групп не наблюдалось. В результате интегральной оценки наибольшие количественные изменения клинико-лабораторного статуса регистрировались у больных с сБА, осложненной ХОБЛ (3/1) или АД (3/1). Далее шли три варианта бронхиальной астмы – сБА (4/II), экБА (4/II) и энБА (4/II). Наконец, менее существенными оказались вариации параметров при ХОБЛ (5/III) (табл. 1).

Качественный анализ диагностических иммунных маркеров при отдельных нозоформах НВЗЛ

Таблица 1. Особенности клинико-лабораторного статуса у больных НВЗЛ до лечения

Нозо- формы	Показатели			Сумма рангов/ выраженность отличий	ФРИС
	гематологические	иммунные	клинические		
сБА	46/2	74/1	100/1	4/II	$L_2^+CD4_2^-CD3_2^-$
экБА	69/1	63/2	100/1	4/II	$L\phi_2^-CD8_2^-CD4_2^-$
энБА	46/2	79/1	100/1	4/II	$ПЯ_3^+CD3_2^-HCTcp_2^+$
ХОБЛ	38/2	63/2	100/1	5/III	$CD3_2^-MCM_3^+CD8_2^+$
сБА + ХОБЛ	77/1	74/1	100/1	3/I	$CD8_2^+IgM_2^+ЦИК_2^+$
сБА + АД	67/1	68/1	100/1	3/I	$ИЛ4_3^+ФЧ_3^+IgA_2^-$

Примечание: числитель – процент достоверно измененных показателей, знаменатель – ранг; I–II–III – уровни отличий показателя: максимальный (I), средний (II), минимальный (III); Л – лейкоциты, Лф – лимфоциты, ПЯ – палочко-ядерные нейтрофилы, HCTcp – спонтанный тест восстановления нитросинего тетразолия, ФЧ – фагоцитарное число. Здесь и в табл. 2 и 3. Остальные обозначения в тексте.

Таблица 2. Собственный независимый от традиционного лечения клинико-лабораторный эффект модулятора нуклеината натрия при НВЗЛ

Нозо- формы	Показатели			Сумма рангов/эффективность	ФМИсоб
	гематологические	иммунные	клинические		
сБА	15/3	29/3	40/2	8/II	$CD3_3^+CD19_3^+IgA_2^-$
экБА	15/3	45/2	60/2	7/I	$L\phi_3^+HCTak_3^+CD4_3^+$
энБА	8/3	37/2	40/2	7/II	$CD4_3^+ФЧ_3^+IgA_2^-$
ХОБЛ	39/2	32/3	40/2	7/I	$IgA_3^-CD19_3^+CD3_3^+$
сБА + ХОБЛ	15/3	32/3	20/3	9/III	$L_3^-CD3_3^+ИЛ6_2^-$
сБА + АД	8/3	32/3	20/3	9/III	$ИЛ4_3^+ФЧ_3^+IgA_2^-$

показал, что при смешанной бронхиальной астме преимущественными были лейкоцитоз, снижение количества Т-клеток и Т-хелперов, при экзогенной бронхиальной астме – лимфопения с уменьшением уровня регуляторных субпопуляций лимфоцитов, а при эндогенной бронхиальной астме отмечалось накопление незрелых гранулоцитов (ПЯ-нейтрофилов) на фоне супрессии Т-клеток и активации кислородного метаболизма нейтрофилов. При хронической обструктивной болезни легких отмечался дефицит общих Т-лимфоцитов в сочетании с избытком МСМ и Т-цитотоксических лимфоцитов. В то же время при ассоциации смешанной бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких произошла активация иммунного статуса по киллерным цитотоксическим Т-лимфоцитам, IgM и ЦИК, а при смешанной бронхиальной астме с аллергическим дерматитом – гиперпродукция ИЛ-4, стимуляция фагоцитарного числа на фоне гипои иммуно-

глобулинемии А. Складывается впечатление, что при комбинированной иммунопатологии у больных наблюдается излишняя мобилизация иммунной реактивности, а в остальных случаях – ее супрессия или дисбаланс.

Для оценки клинико-лабораторной эффективности, как упоминалось выше, анализировалась собственная активность модулятора нуклеината натрия, независимая от традиционного лечения НВЗЛ. В табл. 2 представлена ее количественная и качественная компонента.

Действие НН определяет значимое увеличение гематологических маркеров, в сравнении с исходным уровнем, у пациентов с ХОБЛ (39/2), а также экБА (15/3), сБА + ХОБЛ (15/3) и сБА (15/3). По иммунным показателям подобные изменения отмечены при экБА (45/2), энБА (37/2), сБА + ХОБЛ (32/3), сБА + АД (32/3) и ХОБЛ (32/3).

Клиническая эффективность иммунотерапии НН также оказалась максимально высокой при

Таблица 3. Особенности иммунологического статуса у больных ГВЗ до лечения

Нозо-формы	Показатели		Сумма рангов/выраженность отличий	ФРИС
	гематологические	иммунологические		
ГП	100/1	58/2	3/II	$L_2^+CD4_2^-CD3_2^-$
ОХПН	100/1	75/1	2/I	$L\phi_2^-CD8_2^-CD4_2^-$
ОХСО	100/1	67/1	2/I	$ПЯ_3^+CD3_2^-HCT_{сп_2}^+$
ГИМТ	100/1	54/2	3/II	$CD3_2^-MCM_3^+CD8_2^+$
ГИМТ + АД	100/1	67/1	2/I	$CD8_2^+IgM_2^+ЦИК_2^+$
ГИМТ + ИЭ	100/1	58/2	3/II	$ИЛ_3^+ФЧ_3^+IgA_2^-$

экБА (60/2), сБА (40/2), энБА (40/2) и ХОБЛ (40/2). В итоге была выявлена определенная последовательность по степени выраженности общего ответа (по всем клинико-лабораторным параметрам) на иммунокоррекцию: сБА + ХОБЛ, сБА + АД → сБА, энБА → ХОБЛ, экБА.

Основными мишенями НН в лимфоидной системе оказались: при сБА – Т- и В-клетки и IgA; при экБА – лимфоциты, активированный кислородный метаболизм фагоцитов, Т-хелперы; при энБА – Т-хелперы, поглотительная функция лейкоцитов и IgA; при ХОБЛ – В- и Т-лимфоциты и IgA. Важно отметить, что при сБА + ХОБЛ ответом на действие препарата явилось изменение количества лейкоцитов, Т-лимфоцитов и провоспалительного ИЛ-6, тогда как при сБА + АД у больных ответ был выражен повышением фагоцитарного числа, уровня провоспалительного ИЛ-4 и снижением уровня IgA.

Эти данные свидетельствуют о способности НН при разных видах НВЗЛ или их комбинаций полностью или существенно менять состав ключевых мишеней влияния на иммунную систему независимо от традиционного лечения. В результате в спектре действия НН оказались Т- и В-лимфоциты, их регуляторные субпопуляции, иммуноглобулины класса А, про- и противовоспалительные интерлейкины и поглотительная и кислородиндуцирующая способность нейтрофилов.

Поскольку при обследовании пациентов с шестью нозоформами ГВЗ стандартной была лишь панель гематологических и иммунных показателей, только по этим маркерам и проводилась интегральная количественная и качественная оценка лабораторного статуса в стадии обострения заболеваний (табл. 3).

Качественная оценка выявила общую (типичную, стандартную) реакцию рутинных гематологических маркеров на воспаление у больных с ГВЗ – у всех больных отмечался лейкоцитоз, нейтрофилез, эозинофилез, моноцитоз, лимфопения, а также ускоренная СОЭ. Количественные расче-

ты показали одинаково высокий уровень изменений параметров при всех формах гнойно-воспалительной патологии. Таким образом, рутинная гемограмма в силу своей неспецифичности тестирует только воспаление, но не имеет диагностического значения при конкретных нозоформах ГВЗ. У больных регистрировались и стереотипные реакции иммунной системы (в большинстве случаев – в сумме по 14 параметрам): с отрицательной динамикой уровня Т-клеток, Т-хелперов и IgA и с положительной – ЦИК, МСМ, IgM, цитотоксических Т-лимфоцитов, палочко-ядерных нейтрофилов, фагоцитарного показателя, спонтанного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, противовоспалительного ИЛ-4, а также и провоспалительных ИЛ-6, -7, -8 (в таблице не показано).

Напомним, что у пациентов с НВЗЛ (с более сходным патогенезом) таких маркеров было 13.

Степень выраженности иммунопатологии различалась в разных группах и максимально выражена у пациентов с ОХПН (75/1), ГИМТ + АД (67/1) и ОХСО (67/1). Итоговое распределение нозоформ ГВЗ по выраженности отличий иммуно-лабораторных показателей от нормативного (реперного) уровня здоровых людей позволило выстроить следующий снижающийся рейтинг: ОХПН, ГИМТ + АД, ОХСО (2/1) → ГИМТ + ИЭ, ГП, ГИМТ (3/II).

Для выявления собственного клинико-лабораторного эффекта модулятора галавита проанализированы и стандартные для всех нозоформ ГВЗ иммуногематологические показатели, и специфические для каждого вида заболеваний бактериологические и клинические параметры. Поскольку действие каждого варианта лечения гнойно-воспалительного процесса на вышеперечисленные параметры математически элиминировалось (что означает устранение математическими методами эффекта традиционного лечения из комплексного лечения – традиционного в сочетании с иммуномодулятором), мы сочли возможным сопоставлять эти данные у больных из

Таблица 4. Собственный клинико-лабораторный эффект модулятора галавита при ГВЗ

Нозо- формы	Показатели				Сумма рангов/эффект	ФМИсоб
	гематологические	иммунные	бактериологические	клинические		
ГП	0/3	33/2	0/3	0/3	11/III	ФНО ₃ ⁻ CD Fas ₃ ⁻ IgM ₂ ⁺
ОХПН	17/3	38/2	0/3	67/1	9/II	ФП ₃ ⁺ НСТсп ₃ ⁺ IgG ₃ ⁻
ОХСО	0/3	50/2	17/3	67/1	9/II	НКТ ₃ ⁺ ЦИК ₃ ⁻ IgM ₃ ⁻
ГИМТ	33/2	29/3	67/1	75/1	7/I	ФЧ ₂ ⁺ НСТсп ₂ ⁺ Так ₂ ⁺
ГИМТ + АД	50/2	21/3	33/2	25/3	10/III	Тц ₂ ⁺ МСМ ₂ ⁻ ИЛ ₄ ⁺
ГИМТ + ИЭ	33/2	25/3	33/2	50/2	9/II	НСТак ₃ ⁺ ИЛ ₃ ⁺ CD11b ₃ ⁺

Примечание: ФНО – фактор некроза опухоли, CD Fas – лимфоциты с экспрессией антигена апоптоза (FAS/APO-1), CD11b – лимфоциты с экспрессией молекул интегрина, Тц – киллерные цитотоксические Т-лимфоциты, НКТ – естественные киллеры тимусные, остальные обозначения см. выше.

различных групп, хотя и с определенной долей условности (табл. 4).

Как следует из данных табл. 4, галавит обусловил умеренное (среднее) действие на гематологические маркеры воспаления как у больных с ГИМТ (33/2), так и с ГИМТ, осложненной аллергическим дерматитом (50/2) или истинной экземой (33/2).

Средний эффект коррекции иммунных маркеров был установлен при обострении воспаления придатков матки (50/2), почек (38/2), глубокой пиодермии (33/2) и несущественный при ГИМТ (29/3), ГИМТ + ИЭ (25/3), ГИМТ + АД (21/3).

Безусловное преимущество по нормализации бактериологических показателей было показано при ГИМТ (67/1) и несколько меньше при ГИМТ + АД (33/2) и ГИМТ + ИЭ (33/2).

Максимальный клинический эффект был достигнут у больных с ГИМТ (75/1), ОХСО (67/1), ОХПН (67/1); минимальный – при ГП (0/3).

Таким образом, наивысший итоговый уровень коррекции изученных клинико-лабораторных показателей под влиянием галавита наблюдался при ГИМТ (7/1), далее практически равнозначно при ГИМТ + ИЭ (9/II), ОХСО (9/II), ОХПН (9/9/II). Фактически отсутствие эффективности коррекции отмечалось при ГИМТ + АД (10/III) и ГП (11/9/III).

Отдельный интерес представляло изучение распределения собственного действия модулятора галавита, независимого от базового лечения, на иммунные показатели больных с различными нозоформами ГВЗ. Так, у страдающих ГП регистрировалось преимущественное снижение концентрации провоспалительного ФНО, лимфоцитов с экспрессией антигена апоптоза (FAS/APO-1) и повышение уровня IgM. Тот же эффект отмечен при ОХПН (активация фагоцитоза с гипои иммуноглобулинемией G), при ОХСО

(повышение тимусзависимых НК на фоне падения уровня ЦИК и IgM), при ГИМТ (потенцирование поглотительной и метаболической функции фагоцитов и увеличение числа Т-активных клеток), при ГИМТ + АД (накопление цитотоксических Т-лимфоцитов в сочетании с уменьшением содержания индукторов токсикокоза МСМ и увеличением числа ИЛ-4), при ГИМТ + ИЭ (активация кислородного метаболизма фагоцитов, противовоспалительного ИЛ-4, повышение содержания лимфоцитов с экспрессией молекул интегрин CD11b).

Таким образом, при использовании синтетического модулятора галавита на клинической модели ГВЗ принципиально воспроизведен феномен модификации действия препарата под влиянием клинических особенностей патологического процесса.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А сейчас подробно разберем наши ранее выполненные исследования (очень высокий иммунотропный эффект в данном случае не приводится), в которых главное внимание было уделено следующим показателям: микробиологическим характеристикам гнойных очагов, которые хирургически санировались; развитию грануляционного заживления ран; продолжительности лихорадочного периода; периоду госпитализации пациентов (Земсков и др., 1994).

В исследованиях принимали участие пациенты с гнойной инфекцией мягких тканей, которые, кроме хирургического местного лечения гнойных очагов, получали противовоспалительные и антибактериальные препараты, общеукрепляющую терапию, по показаниям дезинтоксикационные средства и различные физиотерапевтические процедуры. Пациенты в группе лечения иммуно-

модулятором, кроме описанной традиционной терапии, получали НН по 1.5 г в сут на протяжении 12 дней.

У пациентов, не получающих иммуномодулятор, из гноя очагов у $72.7 \pm 5.8\%$ в исходный период высевался *Staphylococcus aureus*, чувствительный к 4–5 антибиотикам второго поколения; у $9 \pm 3.7\%$ выявлялась *E. coli* с чувствительностью к трем антибиотикам; у $4.5 \pm 2.7\%$ обнаруживались микробные ассоциации, вообще нечувствительные к антибиотикам; у $2 \pm 0.1\%$ пациентов выделялись условно патогенные микробы, чувствительные к $2 \pm 0.2\%$ антибиотиков; у $4.5 \pm 2.7\%$ — микроорганизмы вообще не выявлялись. После проведения традиционной терапии обнаружение в ране *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, микробных ассоциаций, нечувствительных к антибиотикам, ассоциаций условно патогенной флоры и стерильные посевы составили соответственно 60.7 ± 6.4 , 7 ± 3.8 , 14 ± 4.2 , 7 ± 3.2 и $6 \pm 0.6\%$. То есть изменения показателей были недостоверны ($p > 0.05$). Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам снизилась до 2–3 наименований из 12–14 препаратов, что позволяет это расценивать как неблагоприятный признак.

Совершенно иные результаты были получены у пациентов, получающих лечение в комбинации с НН. Так, в исходный период *Staphylococcus aureus* выявлялся у $90.5 \pm 4.1\%$ с чувствительностью к $50 \pm 0.5\%$ антибиотиков второго поколения, а после лечения у $46 \pm 7\%$ с чувствительностью уже к $7 \pm 0.4\%$ антибиотиков ($p > 0.05$). Полностью исчезли из ран микробные ассоциации *E. coli*. По условно патогенным микроорганизмам различия не получено. При этом рост патогенной флоры в исходный период составил $38 \pm 6.6\%$, а после лечения НН — $0.0 \pm 0.0\%$ ($p < 0.05$). Применение НН обусловило сокращение лихорадочного периода до 4.5 ± 0.4 дней, в сравнении с пациентами, не получавшими НН — 5.9 ± 0.6 дней.

У пациентов, получающих только традиционное лечение, появление грануляций начиналось с 3-го дня с максимумом на 6-е сут у $32 \pm 5.6\%$ больных (в среднем на 5.9 ± 0.6 день). В группе больных, получающих дополнительно НН, заживление также начиналось с 3-го дня, но с максимумом на 4-е сут у $39 \pm 7.5\%$ больных (в среднем на 4.1 ± 0.4 день, $p < 0.05$). Иными словами, отмечалась интенсификация и ускорение процесса заживления ран под влиянием НН. Это способствовало укорочению общего периода госпитализации с удовлетворительным течением процесса с 15.1 сут у пациентов, получающих традиционную терапию, до 12 сут у пациентов, в лечении которых применяли НН. Госпитализация больных со среднетяжелым процессом, получающих НН, продолжалась 14.7 сут, а получающих только традиционную терапию — 16.8 сут. Продолжитель-

ность госпитализации пациентов с тяжелым процессом соответственно составила 34.2 и 40.9 сут.

Все представленные выше данные обосновывают применение НН при лечении гнойных инфекций мягких тканей. Каких-либо обострений или утяжелений патологического процесса нами не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при сопоставлении данных рутинного клинико-лабораторного обследования более 400 больных, страдающих шестью нозоформами неспецифических воспалительных заболеваний легких и шестью вариантами гнойно-воспалительных заболеваний, подвергнутых традиционной терапии либо комплексному лечению, сочетающему традиционную терапию с модуляторами различного происхождения и механизма действия — нуклеинатом натрия или галавитом, установлены следующие закономерности и феномены.

У пациентов, сгруппированных по НВЗЛ и ГВЗ, индуцируются типовые, общие иммуно-лабораторные расстройства и специфические, диагностически значимые изменения сигнальных маркеров, объединенных в формулы расстройств иммунной системы (ФРИС). Интегральная оценка ранговым методом вариаций гематологических, иммунных, бактериологических, клинических показателей позволяет охарактеризовать выраженность их отличий от заданного уровня одним числом и выстроить рейтинг изменения параметров конкретных нозоформ, например, при НВЗЛ: сБА + ХОБЛ, сБА + АД → сБА, энБА, экБА → ХОБЛ; а при ГВЗ: ГИМТ+АД, ОХСО, ОХПН → ГИМТ + ИЭ, ГИМТ, ГП.

Нативный (нуклеинат натрия) и синтетический (галавит) иммуномодуляторы на клинических моделях НВЗЛ и ГВЗ обуславливают существенные комплексные изменения не только иммунных, но и рутинных гематологических, бактериологических и клинических показателей у больных.

Снижающийся рейтинг итоговой клинико-лабораторной ответственности отдельных нозоформ НВЗЛ на нуклеинат натрия оказался таким: экБА → ХОБЛ → сБА → энБА → сБА + ХОБЛ → сБА + АД → ХОБЛ. Ответ на галавит проранжирован следующим образом: ГИМТ → ОХПН → ОХСО → ГИМТ + ИЭ → ГИМТ + АД → ГП.

При определении собственного эффекта модуляторов (ФМИСоб), независимого от традиционного лечения, установлено, что особенности патогенеза могут существенно варьировать влияние препаратов на лимфоидную систему. В результате в спектре действия нуклеината натрия у больных с НВЗЛ значатся: Т- и В-клетки, их регуляторные субпопуляции, иммуноглобулины класса А, плотительная и кислород-индуцирующая способ-

ность нейтрофилов, про- и противовоспалительные интерлейкины; а для галавита при ГВЗ: Т-активные, Т-цитотоксические лимфоциты, естественные киллеры тимусзависимые, лимфоциты с экспрессией антигена апоптоза FAS/Apo-1 и экспрессией интегриновых молекул адгезии CD11b, иммуноглобулины классов М и G, молекулы средней массы, циркулирующие иммунные комплексы, поглотительная и кислород-индуцирующая функция нейтрофилов, про- и противовоспалительные интерлейкины, фактор некроза опухоли. Применение нуклеината натрия при гнойных инфекциях мягких тканей способствует очищению ран от микроорганизмов, повышая их антибиотикочувствительность, ускоряет образование грануляций в ранах и их заживление, сокращает лихорадочный период патологического процесса и период госпитализации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась в рамках Программы плановых исследований НИР в Национальном исследовательском центре хирургии им. А.В. Вишневского (Москва) и в Воронежском государственном медицинском университете им. Н.Н. Бурденко.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам

институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Разрешения от каждого из включенных в исследование участников и информированное добровольное согласие не требуются, поскольку пациенты подвергались исследованиям в плане оказания медицинской помощи, предусмотренной Минздравом России в условиях стационарного лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горелик А.Л., Скрипкин В.А.* Построение систем распознавания. М.: Высшая школа, 1977. 222 с.
- Земсков А.М., Передерий В.Г., Земсков В.М., Бычкова Н.Г.* Иммунокорректирующие нуклеиновые препараты и их клиническое применение. Киев: Здоров'я, 1994. 229 с.
- Земсков А.М., Земсков В.М., Караулов А.В.* Клиническая иммунология. М: МИА, 1999. 603 с.
- Иммунотерапия. Руководство для врачей / Ред. Р.М. Хаитов, Р.И. Атауллаханов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 669 с.
- Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Ред. А.А. Воробьев. М.: МИА, 2012. 704 с.
- Новиков Д.К., Новиков П.Д.* Клиническая иммунопатология. М.: Медицинская литература, 2009. 464 с.
- Петров Р.В.* Иммунология. М.: Медицина, 1987. 412 с.
- Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г.* Иммунология: норма и патология. М.: Медицина, 2010. 748 с.
- Энциклопедия иммунологии. В 5 томах / Ред. А.М. Земсков, В.М. Земсков, В.А. Черешнев. М.: Триада-Х, 2013. 1970 с.

Innovative Technologies in Interpreting the Results of Traditional Clinical and Laboratory Examination of Patients with Nonspecific Inflammatory Lung Diseases and Purulent Inflammatory Diseases

V. M. Zemskov^{a, *}, A. M. Zemskov^b, A. A. Barsukov^a,
M. N. Kozlova^a, V. A. Zemskova^b, N. S. Shishkina^a, and V. S. Demidova^a

^a*Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia*

^b*Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia*

*e-mail: arturrego@yandex.ru

Analytical technologies were used for an integral comparative assessment of the results of a traditional examination of patients with individual nosological forms of non-specific inflammatory diseases of the lungs (NILD) and pyoinflammatory diseases (PID). The studies concerned changes in the clinical and laboratory status in general, an increase in the overall activity of treatment due to sodium nucleinate and galavit, and the determination of the "own" effect of modulators independent of traditional therapy. Using modern methods, typical hematological, immune, bacteriological and clinical parameters were assessed in patients.

Keywords: non-specific inflammatory diseases of the lungs, purulent-inflammatory diseases, sodium nucleinate, galavit