

УДК 638.154.4–084

**РАСТИТЕЛЬНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ АСКОСФЕРОЗА ПЧЕЛ****В.И. Домаш<sup>1</sup>, М.И. Черник<sup>2</sup>, М.А. Белозерский<sup>3</sup>, Я.Е. Дунаевский<sup>3</sup>, О.А. Иванов<sup>1</sup>, Т.Г. Шабашова<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь<sup>2</sup>Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Минск, Беларусь<sup>3</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Россия

Благодаря хорошей приспособляемости к различным условиям внешней среды микроскопические грибы успешно выдерживают конкуренцию с другими микроорганизмами и часто вытесняют их в жизненной борьбе с того или иного субстрата. Патогенные грибы многочисленны, а вызываемые ими заболевания человека, животных и насекомых весьма разнообразны. Патогенными для медоносной пчелы являются грибы родов *Ascosphaera*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* и др.

Физические, химические, биологические, стрессовые факторы (экстремальные температуры, высокая влажность, загрязнение окружающей среды пестицидами, бесконтрольное применение антибиотиков, паразитарные инвазии) вызывают снижение резистентности организма насекомого, подавляя иммунную систему и нарушая защитные барьеры оболочек тела, пищеварительного тракта, трахей и способствуют развитию грибковых инфекций пчел.

Споры грибковых инфекций пчел, могут годами находиться в ульях, на пасеке и перейти в активное состояние в любой момент. Одно из таких заболеваний – аскосфероз пчел, который представляет серьезную угрозу заболевшим семьям, способствует ослаблению насекомых, снижению медосбора и опыления, иногда приводит к гибели. Болезнь наносит ущерб всей отрасли как самостоятельно, так и в купе с другими инфекциями и инвазиями.

Аскосфероз пчел (*Ascosphaerosis*) – инфекционная болезнь, вызываемая грибом *Ascosphaera apis*, характеризующаяся поражением трутневых, пчелиных личинок и куколок, в редких случаях поражаются маточные личинки.

Существующие методы борьбы с микозами пчел в большинстве основаны на применении, в основном, препаратов химического происхождения. Однако вопрос о вредном влиянии препаратов, полученных методом химического синтеза, всегда интересовал и тревожил ученых и пчеловодов. В связи с этим, возникла необходимость внедрения в пчеловодческую практику экологически чистых средств с использованием лекарственных растений. Разностороннее изучение вопроса о применении лекарственных растений в практике пчеловодства показало, что лекарственные растения весьма широко и успешно применяются пчеловодами для борьбы с различными болезнями пчел, для стимуляции роста и развития пчелиных семей, для увеличения их продуктивности. Известно, что любые препараты, приготовленные с растительным сырьём, экологически чистые, не оказывают вредного воздействия на продукты пчеловодства и жизнедеятельность пчелиных семей, а также имеют целый ряд преимуществ, поскольку содержат комплекс биологически активных веществ, которые при введении в организм, даже в очень малых количествах, вызывают определенный физиологический эффект, благоприятно влияют на организм, обладают меньшим побочным действием, лучше переносятся организмом.

Для получения экзогенных пептидаз гриба и исследования действия на него растительных биологически активных веществ необходимо было разработать способы выращивания мицелия патогена. Особое внимание было уделено также белкам-ингибиторам протеолитических ферментов, которые обладают регуляторными, антиоксидантными и защитными свойствами. [1,2]. Растительные ингибиторы протеиназ обнаружены в тканях животных, растений и микроорганизмов. Способность белковых ингибиторов подавлять активность протеиназ млекопитающих, насекомых и микроорганизмов легли в основу представлений об их защитных функциях. Большое внимание в последнее время уделяют поиску ингибиторов среди дикорастущих видов растений, поскольку они являются поистине неоценимым и богатейшим источником разнообразных форм этих белков. Культуру энтомопатогена (*Ascosphaera apis*) получали из рабочей колонии микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Исследовали рост гриба на различных питательных средах: картофельно-декстрозный агар с 0,4 % дрожжевым экстрактом, суслый агар и агар Сабура. Посевы гриба делали на поверхность агара в центре чашки Петри одной точкой при помощи микологической иглы. Изучали рост колоний гриба в течение 10 суток. Результаты исследований показали, что оптимальной средой для выращивания мицелия гриба является картофельно-декстрозный агар с 0,4 %-ным дрожжевым экстрактом. На рис. 1 представлен общий вид 3-х дневного мицелия.

Исследования показали, что оптимальные условия для прорастания спор, роста и развития гриба: pH 5,5–7,5 и температура 30°С, такие же условия были использованы для культивирования гриба в жидкой среде Чапека с добавлением казеина и пептона. Гриб выращивали на протяжении 20 суток. Наиболее высокая активность экзопептидаз наблюдалась на 15–17 сутки. Протеазы в культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония до 80 %-ного насыщения и исследовали ее физико-химические свойства. Оказалось, что активность фермента ингибируется ФМСФ, что указывает на принадлежность его к классу сериновых протеиназ (химотрипсиноподобным и /или субтилизиноподобным) и металлопротеазам.

Для поиска биологически активных растительных веществ были отобраны 20 видов культурных и дикорастущих растений флоры Беларуси. Было установлено, что наиболее высокая активность ингибиторов протеиназ (трипсина) характерна для корней крапивы двудомной. Этот наиболее распространенный вид растений был взят в качестве растительного сырья для получения препарата защитного действия. Воздушно сухие корневище и корни крапивы размалывали в муку, которую экстрагировали 0,2 М NaCl в соотношении 1:20 соответственно, в течение 10–12 часов при температуре 4–5°С, смесь центрифугировали 15 минут при 6000 об/мин и температуре 4–5°С. Экстракт подкисляли 0,5 н HCl до pH 4,0 в течение 2–3 часов до образования осадка, который снова центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин. Из полученной надосадочной жидкости высаливали белки сульфатом аммония до 80 % насыщения в течение 24 часов, после центрифугирования осадок суспендировали в 30 мл дистиллированной воды и наносили на колонку с акрилексом Р-30 (гелем на основе полиакриламида), уравновешанной дистиллированной водой. Элюцию осуществляют дистиллированной водой при скорости 20 мл/час. Общий профиль хроматографии представлен на рис. 2.



Рис. 1 – Общий вид 3-х дневного мицелия *Ascosphaera apis*

Ингибиторные фракции белка выходили в объеме элюата 80–180 мл. Их собирали и лиофильно высушивали. Как показали исследования, ингибитор принадлежит к классу сериновых протеиназ, обладает высокой термо – и pH-устойчивостью. Белок содержит ингибитор трипсина с молекулярной массой 8–22 кДа, белок-ингибитор химотрипсина с молекулярной массой 23–25 кДа, белок с молекулярной массой 50–70 кДа и дистиллированную воду. Соотношение компонентов следующее: белок-ингибитор трипсина – 40, белок-ингибитор химотрипсина – 20, белок-10 мас.%, остальное – вода.

Результаты исследований показали, что при внесении растительного препарата белковых ингибиторов в среду они угнетали прорастание спор и активность экзогенных пептидаз энтомопатогена *Ascosphaera apis* на 50–80 %. (табл. 1).

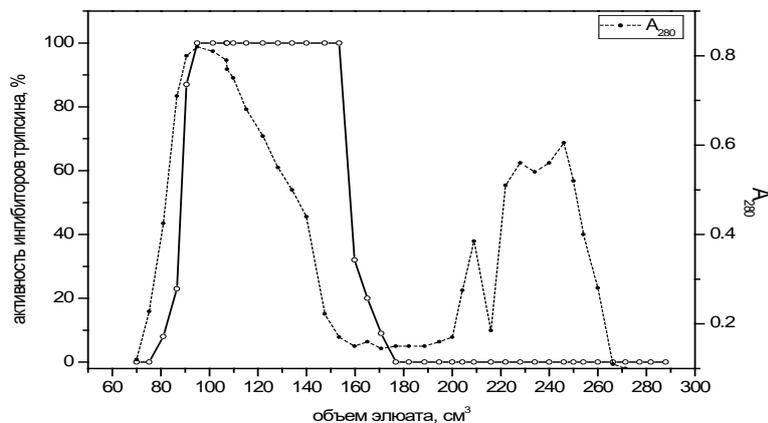


Рис. 2 – Гель-хроматография белков-ингибиторов трипсина из корневищ крапивы двудомной (*Urtica dioica*) на акрилексе Р-30

Таблица 1– Действие препарата на активность протеолитического фермента гриба *Ascosphaera apis*

Концентрация, %	Активность протеолитического фермента, ЕА/мл	% угнетения
Контроль (вода)	48,0	-
0,25	25,2	47,5
0,50	10,0	79,2

Угнетение площади роста энтомопатогена на 6 сутки составляло 88–100 %. (табл. 2).

Таблица 2. Действие различных концентраций препарата на площадь роста (см<sup>2</sup>) энтомопатогена *Ascosphaera apis*

Концентрация, мкг/мл	Площадь через 6 суток роста, см <sup>2</sup>	% угнетения
Контроль(вода)	2,5	-
250	0,3	88
500	0	100

Таким образом, препарат полученный нами из корневищ крапивы двудомной (*Urtica dioica*) позволяет использовать большие запасы данного вида растений в Республике Беларусь для борьбы с энтомопатогенным грибом *Ascosphaera apis*, вызывающего аскофероз пчел. [3,4]. Планируется дальнейшая работа по испытанию препарата в производственных условиях.

*Работа поддержана грантами БРФФИ № Б18Р-053 и РФФИ № 18-54-0008-Бел.*

#### ЛИТЕРАТУРА

Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений. // Прикл. биохимия и микробиол. -2005, Т.41, № 3. – С. 261–283.

Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А. Участие протеолитических ферментов и ингибиторов в защите растений (обзор). // Прикл. биохимия и микробиол. -2001. – Т.37, № 2. – С. 131–140.

Способ получения средства для борьбы с энтомопатогенным грибом *Ascosphaera apis* : пат. 22490 С2 Респ. Беларусь, МПК А 61 К 36/185 (2006) / В.И. Домаш, М.И. Черник, М.А. Белозерский, Я.Е. Дунаевский, О.А. Иванов, Т.Г. Шабашова, заявитель ГНУ "Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси". – № а 20140085; заяв. 31.01.14; опубл. 30.10.15 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2019. – № 2. – С. 117–118.

Состав для борьбы с энтомопатогенным грибом *Ascosphaera apis* : пат. 22491 С2 Респ. Беларусь, МПК А 61 К 36/185 (2006) / В.И. Домаш, М.И. Черник, М.А. Белозерский, Я.Е. Дунаевский, О.А. Иванов, Т.Г. Шабашова, заявитель ГНУ "Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси". – № а 20140086; заяв. 31.01.14; опубл. 30.10.15 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2019. – № 2. – С. 118.

УДК 641.05

### ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА ЛЮЦЕРНЫ НА СОРБИРОВАННЫЕ СВОЙСТВА ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ

*Л.Э. Глаголева, Александра А.В*

*Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все более актуальной становится проблема состояния здоровья людей. Возрастающее внимание мирового научного сообщества к вопросу загрязнения окружающей среды и организма человека тяжелыми металлами, привел к необходимости детального изучения механизма их поступления, распределения и накопления в организме их токсичного действия. В организм токсичные вещества могут попадать через органы дыхания (80–90 % в условиях производств), кожу и желудочно-кишечный тракт.

Питание является одним из важнейших факторов в профилактике и лечении заболеваний. Известно, что более 30 % населения страны имеет избыточный вес и около 10 млн. человек страдают сахарным диабетом, около 50 млн. нуждаются в диете антисклеротической направленности и примерно столько же в лечебнопрофилактических продуктах при заболевании органов пищеварения.