

УДК 582.282.22

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КАЛЬЦИЙ-МОДУЛИРУЮЩИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ *ASPERGILLUS AWAMORI*

О.В. Козлова, А.В. Черемных, С.Ю. Егоров, Ф.Г. Куприянова-Ашина

Аннотация

Была изучена взаимосвязь между характером роста культуры *Aspergillus awamori* в среде Вогеля и уровнем цитозольного кальция, меняющегося под влиянием различных кальций-модуляторов. Было установлено, что физиологические стимулы (механическое воздействие, гипоосмотический шок и увеличение концентрации хлористого кальция в среде), индуцирующие кратковременное повышение уровня кальция в клетках микромицет, не оказывали значительного влияния на скорость разрастания колоний, спорообразование и морфологию гифов. Кальций-антагонисты, эффективные ингибиторы активности Ca^{2+} каналов, при добавлении в среду в высоких концентрациях угнетали процесс спорообразования и рост колоний микромицета. Кальций-агонисты, индуцирующие бифазный Ca^{2+} ответ клеток (первичный – за счет механического воздействия, вторичный – вследствие действия агониста), не влияли на степень ветвления гифов, но ингибировали процесс разрастания колоний микромицета. Продолжительные кальциевые всплески, вызываемые фармакологическим препаратом А23187, в значительной степени препятствовали росту и ветвлению гифов и даже приводили к их гибели, о чем свидетельствуют результаты подсчета числа живых (окрашены в зеленый цвет) и мертвых (красные при люминесцентной микроскопии) клеток. Так, ионофор А23187 (10 мкМ) способствовал гибели 50% клеток, в то время как в среде с кофеином (5мМ) погибало приблизительно 5% клеток. В контрольных образцах культур оставались живыми 95% клеток.

Введение

В литературе широко представлена информация о роли кальция как вторичного мессенджера, с помощью которого осуществляется трансдукция различных внешних стимулов и гормональных сигналов в клетках млекопитающих и растений [1, 2]. Однако имеются очень скудные сведения об этом участнике клеточной регуляции у мицелиальных грибов, что обусловлено, в том числе, различиями в архитектонике клеток низших и высших эукариот. Анализ Ca^{2+} -ответа мицелиальных грибов методом рекомбинантного экворина на воздействия ряда физико-химических факторов, а также фармакологических препаратов (блокаторов и стимуляторов кальциевых каналов) показал, что при формировании кальциевого ответа микромицеты обладают несколькими системами транспорта Ca^{2+} , обеспечивающими лабильность уровня этих ионов в цитозоле, а именно такими, как поступление кальция из среды роста и (или) из внутриклеточных резервуаров [3, 4]. Уровень внутриклеточного кальция определяется балансом его поступления, выведения, аккумуляции в резервных клеточных органеллах, соединения с Ca^{2+} -связывающими белками и другими кле-

точными компонентами. Хотя все эти процессы разделены, они могут быть скоординированы друг с другом и тонко регулировать уровень внутриклеточного кальция, а с другой стороны – контролироваться общим регуляторным механизмом.

Вместе с тем, в литературе мало данных о зависимости скорости роста мицелиальных грибов от изменения уровня Ca^{2+} в клетках. Имеются лишь единичные сообщения относительно активного участия Ca^{2+} в регулировании роста окончаний гифов мицелия, а также их ветвления [5, 6]. Тем не менее, неизвестно, какое влияние на спорообразование и морфологию гифов мицелиальных грибов оказывают кальциевые всплески, возникающие в клетках под действием внешних стимулов.

В соответствии с вышеизложенным, целью настоящей работы было выяснение взаимосвязи между клеточным ростом и изменением пула внутриклеточного кальция микромицетов в ответ на внешние воздействия.

1. Условия эксперимента

Объектом исследования был штамм *Aspergillus awamori* 66A, полученный из лаборатории исследования клеток микромицетов Эдинбургского университета. Штамм *A. awamori* 66A представляет собой мутант с экспрессированным фотобелком – экворинном [7], который при взаимодействии с Ca^{2+} распадается на апоэкворин и селентрамид с выделением энергии в голубой части спектра, а интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации Ca^{2+} в цитозоле [8].

Культуру *A. awamori* 66A выращивали в жидкой среде Вогеля в каплях среды (50 мкл) на покровных стеклах, помещенных во влажную камеру, а также в чашках Петри на агаризованной среде (2% агара в среде Вогеля) при температуре 30°C. Исходная концентрация спор 5×10^5 /мл после достижения экспоненциальной фазы роста микромицетов (24 ч) культуру подвергали внешним воздействиям.

Физиологические стимулы находились в пределах толерантных для исследуемого штамма аспергилла. Высокие концентрации Ca^{2+} создавались дополнительным внесением в среду Вогеля CaCl_2 до конечного уровня 0.005–50 мМ. Осмотический шок вызывали разбавлением среды в 3 раза, а механический шок – «взбалтыванием» культур в течение 5 мин. при 140 об./мин. [3].

Фармакологические препараты: Ca^{2+} -антагонисты (La^{3+} – ингибитор активности кальциевых каналов, КР4 – ингибитор активности кальциевых каналов у микромицетов, ВАРТА хелирует кальций) и Ca^{2+} -агонисты (A23187 – ионофор селективного действия ионов кальция, Вг-A23187 – аналог A23187 – нефлуоресцентный, кофеин – стимулятор транспорта ионов кальция из внутриклеточных резервуаров кальция, циклопиазоновая кислота – ЦПК-ингибитор Ca^{2+} АТФазы, способствующей заполнению внутриклеточных резервуаров кальция), использованные в экспериментах, добавляли в среду Вогеля (25 мкл) за 5 мин. до физико-химического воздействия. Препараты вносили в минимально эффективных концентрациях (мМ, мкМ), как показано в работе [3]. В контрольном варианте среда содержала добавленный в нее растворитель препарата в соответствующей концентрации.

Количественный анализ результатов воздействия фармакологических веществ на рост и спорообразование культур *A. awamori* осуществляли при выращивании микромицета в плотной среде Вогеля в чашках Петри. Инокуляцию осуществляли с помощью специальных дисков диаметром 6 мм, которые пропитывали споровой суспензией (5×10^5 спор/мл) и помещали поверх фильтровальной бумаги в центре чашки Петри. Культуру выдерживали при 30°C в течение 24 ч, после чего диск снимали и помещали в среду Вогеля, содержащую исследуемые фармакологические препараты. Контрольные варианты включали растворитель препаратов в соответствующей концентрации. Измерения диаметра колонии микромицета и уровня спорообразования проводили через каждые 24 ч в течение 8 дней.

Исследование ветвления гифов культуры *A. awamori* осуществляли после выращивания ее в жидкой среде Вогеля на покровном стекле в течение 24 ч при 30°C и последующем воздействии внешних факторов: а) внесение в 5% или 100%-ную среду Вогеля хлористого кальция в количестве 10 мМ /50 мкл (при конечной концентрации экзогенного кальция – 5 мМ); б) добавление препарата А23187 в двух концентрациях – 10 и 50 мкМ; в) наблюдение за контрольным образцом. Анализ частоты ветвления гиф проводился с помощью световой микроскопии через 1, 3, 5, и 7 ч после каждого воздействия.

Разрастание ветвления гифов определяли после выращивания культуры *A. awamori* в плотной среде Вогеля на целлофане. Для этого кусочки целлофана диаметром 8.5 см пропитывали дистиллированной водой, покрывали алюминиевой фольгой и автоклавировали (1 атм./30 мин.). Затем каждый кусочек стерильного целлофана переносили на поверхность среды в чашку Петри и наносили бактериальной петлей суспензию спор *A. awamori*. Чашки выдерживали в темноте при 30°C в течение 24 ч, после чего целлофан переносили в среду Вогеля, содержащую исследуемое вещество. Пробы отбирали на покровное стекло вместе с целлофаном и анализировали с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Морфология культуры изучалась с использованием красителя FM4064. С этой целью плотную среду Вогеля засеивали суспензией спор, инкубировали 24 ч при 30°C, затем содержащие мицелий кусочки агара вырезали из среды и помещали в перевернутом виде на среду, содержащую исследуемый фармакологический препарат. В контрольных образцах кусочки агара помещали на среду Вогеля с растворителем препарата. По истечении 30 мин. и далее через каждый час анализировали микроскопическое изображение клеток.

Жизнеспособность клеток определяли с помощью окрашивания живых и убитых микроорганизмов [9]. Данный тест основан на способности иодида пропидиума определять целостность плазматической мембраны, а препарата флуоресцин диацетата (ФДА) – выявлять специфические реакции ферментов в цитозоле. Основные растворы препаратов в концентрации 3 мг/мл готовили отдельно. Иодид пропидиума растворяли в дистиллированной воде, ФДА – в ацетоне и оба препарата смешивали в равных объемах непосредственно перед внесением в культуру. Окрашенные культуры изучали под флуоресцентным микроскопом и регистрировали убитые или поврежденные клетки, излучающие красный цвет, а также живые – окрашенные в зеленый цвет.

Эксперименты проводили в пятикратной повторности, при обработке полученных результатов применяли метод вариационно-статистического анализа с использованием уровня значимости $p < 0.05$.

2. Результаты и обсуждение

Для характеристики роста и морфологии микромицетов, подвергнутых воздействию физико-химических и фармакологических стимулов, изменяющих, как показано [3] пул внутриклеточного кальция, предварительно анализировали рост культуры *A. awamori* в жидкой среде Вогеля без какого-либо воздействия на клетки (контроль). В экспериментах из протестированных четырех концентраций спор в 1 мл инокулята ($5 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^2$) оптимальной для анализа роста микроколоний была концентрация $5 \cdot 10^5$ спор/мл. Через 24–48 ч (экспоненциальная фаза роста) методом фазово-контрастной микроскопии у микроколоний обычно регистрировалась одна длинная проростковая трубка и еще 1–2 трубочки на много короче первой (рис. 1).

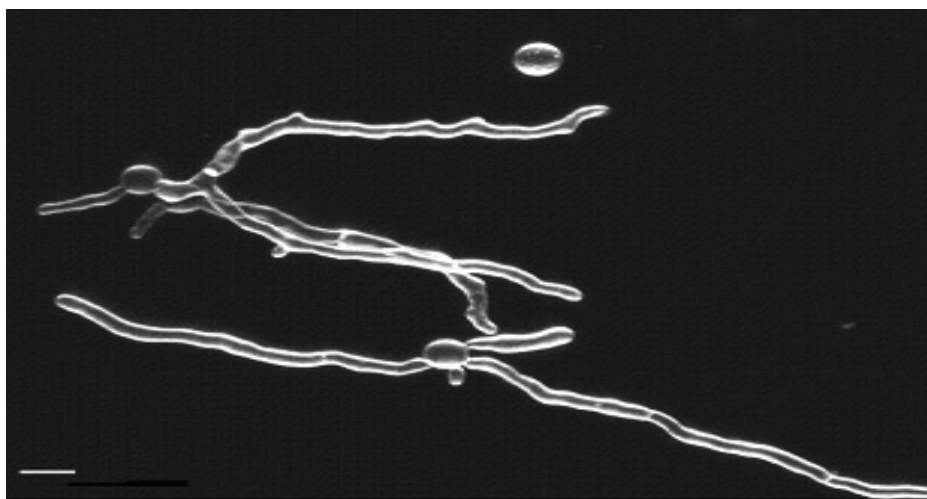


Рис. 1. Микроколонии 24-х часовой культуры *A. awamori*, выращенной в капле жидкой среды Вогеля

Через 72 ч культивирования грибков наступала стационарная фаза роста и через 96 ч – фаза споруляции.

При исследовании влияния на рост микромицетов физико-химических стимулов (механическое воздействие, гипоосмотический шок и повышение концентрации кальция в питательной среде) подсчитывали число ветвей гифов, образующихся от главной (самой длинной) проростковой трубочки в микроколониях 24-х часовых культур. В случае каждого вида воздействия анализировали 75 микроколоний (по 24 на одном покровном стекле). Подсчет осуществляли в течение 7 ч (через 1, 3, 5, 7 ч) после того, как 24-х часовые культуры были подвергнуты воздействию. Данные табл. 1 указывают, что при всех вариантах воздействия на гифы мицелия число разветвлений от главной проростковой трубочки со временем увеличивалось в сравнении с контролем ($p < 0.05$).

Табл. 1

Влияние различных физико-химических стимулов на ветвление гифов мицелия *A. awamori* экспоненциальной фазы роста ($\bar{x} \pm s_x$ – среднее \pm стандартная ошибка)

Время после стимуляции	Контроль	Механическое воздействие	Гипоосмотический шок	Добавление 5 мМ CaCl ₂
1 ч	1.13 \pm 0.05	1.16 \pm 0.05	1.16 \pm 0.05	1.16 \pm 0.05
3 ч	1.46 \pm 0.08	1.54 \pm 0.07	1.47 \pm 0.08	1.57 \pm 0.16
5 ч	1.59 \pm 0.10	1.59 \pm 0.08	1.59 \pm 0.14	1.60 \pm 0.08
7 ч	1.96 \pm 0.12	1.98 \pm 0.14	1.96 \pm 0.9	2.01 \pm 0.08

Из литературы известно [3], что кальциевые вспышки в ответ на примененные виды физико-химических воздействий были очень короткими, и содержание кальция в гифах микромицета восстанавливалось в течение нескольких минут, в результате чего существенных изменений в скорости роста мицелия зарегистрировать не удалось.

Табл. 2

Влияние кальцимицина (A23187) на процесс ветвления гифов *A. awamori*

Время инкубации	Контроль	Добавление 10 мкМ A23187	Добавление 50 мкМ A23187
1 ч	1.27 \pm 0.05	1.08 \pm 0.05	1.06 \pm 0.05
3 ч	1.45 \pm 0.09	1.09 \pm 0.03	1.09 \pm 0.03
5 ч	1.50 \pm 0.07	1.09 \pm 0.03	1.09 \pm 0.03
7 ч	1.90 \pm 0.12	1.09 \pm 0.03	1.09 \pm 0.03

Для полноты информации о зависимости скорости роста аспергилл от содержания внутриклеточного кальция было изучено действие на микромицеты фармакологических препаратов, повышающих активность функционирования кальций-транспортных систем (агонистов). Как известно, A23187 (кальмицин) является мобильным переносчиком ионов, образующим устойчивые комплексы с двухвалентными катионами. В животных клетках (при концентрациях приблизительно 10 мкМ) A23187 стимулирует поступление кальция в цитозоль из внешней среды [10]. В своих экспериментах при тестировании кальций-чувствительного ионофора A23187 выращивали микромицет в капле (50 мкл) жидкой среды Вогеля в течение 24 ч, после чего добавляли разные концентрации препарата. Как показано в табл. 2, препарат в конечных концентрациях 10 мкМ и 50 мкМ/100 мкл среды вызывал значительное подавление ветвления гифов в сравнении с контролем.

Негативное действие кальций-агониста A23187 на ветвление мицелия аспергилл могло быть вызвано неравномерным распределением препарата в жидкой среде. Было обнаружено образование сгустков препарата вокруг гифов при длительном выдерживании в водном растворе. Аналогичная ситуация характерна и для кофеина, который после добавления его в культуральную среду со временем концентрировался вокруг гифов в виде кристаллических структур.

Табл. 3

Влияние агонистов на рост гифов *A. awamori*

[Ca ²⁺]-агонист	0.5 ч	1.5 ч	2.5 ч	3.5 ч	4.5 ч
10 мкМ А23187 (кальцимицин)	да	да	нет	нет	нет
20 мкМ (ЦПК) (цикло-пиазоновая кислота)	да	да	да	да	да
5 мМ кофеина	нет	нет	да	да	да

Да – очевидный рост, нет – отсутствие роста.

С целью исключения возможных артефактов за счет агрегации фармакологических препаратов в жидкой среде, аналогичные исследования были проведены на агаризованной среде Вогеля. Во избежание неспецифических побочных эффектов высоких концентраций кальций-агонистов на рост микромицетов анализ микроскопических изображений гифов мицелия осуществлялся только при воздействии на них минимальных концентраций исследуемых препаратов (табл. 3).

Как оказалось, А23187 полностью ингибировал рост отдельных гифов через 2.5 ч после переноса культуры в среду с препаратом. Однако в среде, содержащей кофеин, рост окончаний мицелиальных гиф возобновлялся через 2.5 ч, а циклопиазоновая кислота (ЦПК) вообще не подавляла рост мицелия в течение 4.5 ч.

Изучение морфологии гифов мицелия методом фазово-контрастной микроскопии показало, что через 1 ч после инкубации культуры с А23187 в конечной концентрации 10 мкМ на окончаниях гифов появлялось много коротких веточек, особенно в верхней части гиф (рис. 2), которые после 2 ч разрывались.

Полученные результаты, очевидно, объясняются увеличением концентрации кальция в клетках *A. awamori*. Причем кальциевый ответ на воздействия агонистов был бифазным: первичный – очень быстрый – вызывался механической стимуляцией клеток микромицетов в процессе внесения препарата, в результате чего происходило поступление кальция из внешней среды, а, возможно, и из клеточных органелл. Вторичный ответ – более продолжительный – мог быть результатом выхода ионов кальция из внутриклеточных резервуаров [3]. Таким образом, на основании результатов исследований можно прийти к заключению, что А23187 убивает клетки гифов микромицета, в то время как кофеин (5мМ) и ЦПК (20 мкМ) не оказывают значительного влияния на морфологию и физиологию мицелиальных гиф. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о том, что последующее за кальциевой вспышкой снижение концентрации кальция в цитозоле является обязательным условием функционирования кальциевой сигнальной системы. Более того, длительное сигнал-индуцированное повышение концентрации ионов кальция может привести к гибели клетки [11].

Далее был проведен анализ влияния кальций-модуляторов на скорость роста колоний и спорообразование микромицета. Исследование действия такого физико-химического стимула, как увеличение концентрации хлористого каль-

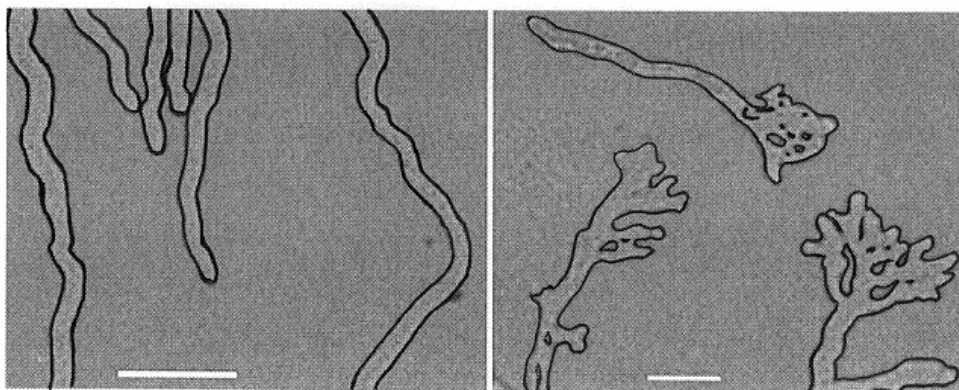


Рис. 2. Влияние А23187 на морфологию и ветвление гифов мицелия *A. awamori*, выращиваемой в агаризованной среде Вогеля в течение 24 ч

ция в среде роста (0.5 мМ и 5 мМ) аспергилла, показало, что он не оказывал влияния на спорообразование, но вызывал после 72-х часовой инкубации увеличение скорости разрастаний колоний в плотной среде.

Анализ изменения скорости разрастания колоний, спорообразования и ветвления гифов мицелия под воздействием на микромицеты фармакологических препаратов (антагонистов) показал, что добавление в среду роста лантанума хлорида в количестве 20 мМ приводило к замедлению роста и процесса спорообразования через 72 ч после воздействия. При этом споры имели светло-коричневый цвет в сравнении с темно-коричневым в контроле, а скорость разрастания колонии сократилась примерно на 30%. Сопоставляя выявленный эффект с известным фактом [3], что лантанум-блокатор кальциевых каналов при концентрации 20 мМ, использованной в наших экспериментах, вызывает вторичную кальциевую вспышку, соответствующую выходу Ca^{2+} из внутриклеточных органелл, можно предположить, что замедление скорости роста аспергилла в присутствии лантанума обусловлено подавлением активности Ca^{2+} -АТФазы, которая отвечает за транспорт кальция из цитозоля.

При исследовании ВАРГА в двух концентрациях (1 мМ и 5 мМ) было установлено, что этот препарат в дозе 1 мМ не оказывал существенного влияния на разрастание колоний и образование спор, но в концентрации 5 мМ он сразу замедлял рост культуры, причем через 24 ч скорость разрастания колоний микромицета составляла 25–30% , через 192 ч – 18–20% по сравнению с контролем, принятым за 100%. Таким образом было показано, что применение таких Ca^{2+} -антагонистов, как хлорид лантанума (эффективно ингибирует Ca^{2+} -каналы L-типа, локализованные в плазматической мембране) и ВАРГА (снижает концентрацию внеклеточного кальция путем его хелирования), в высоких концентрациях (20 мМ и 5 мМ соответственно) замедляло скорость роста колоний и процесс образования спор, что обусловлено, по данным [3], ингибированием кальциевых ответов микромицетов, индуцированных физико-химическими стимулами.

Изменение физиологии аспергилла и процесса спорообразования наблюдалось также при действии на микромицеты кальций-агонистов (А23187, кофеин,

ЦПК). На примере A23187 можно видеть, что через 48 ч после воздействия радиус колонии микромицета возрастал на 54%, а к концу эксперимента (через 192 ч) – только на 38% по сравнению с контролем, принятым за 100%. Кофеин (5мМ) сильно замедлял разрастание колонии так, что в конце эксперимента его скорость составляла лишь 10% в сравнении с контролем.

Применение ЦПК в концентрации 20 мкМ приводило к незначительному замедлению роста клеток через 96 ч после воздействия и никак не влияло на процесс спорообразования.

Результаты подсчета числа живых и мертвых клеток в культурах, подвергнутых воздействию кальций-агонистов, показали, что ионофор A23187 (10 мкМ) способствовал гибели 50% клеток, в то время как при воздействии кофеином (5 мМ) после 3-х часовой инкубации погибало лишь около 5% клеток, возможно, вследствие естественного отмирания гифов мицелия или механического воздействия на клетки в процессе переноса препарированных культур на предметное стекло для микроскопии. Количество же живых гифов (окрашенных в зеленый цвет) в контрольных и опытных образцах культур было примерно одинаковым (95%). Аналогичные результаты были получены при воздействии на микромицет циклопиазоновой кислоты (ЦПК в концентрации 20 мкМ).

Итак, показано, что, используемое клеткой в качестве сигнального интермедиата, повышение концентрации кальция в цитозоле, способствует регуляции роста развития микромицета. При этом длительное сигнал-индуцированное повышение концентрации ионов кальция может привести к гибели клеток. Необходимо иметь в виду и то, что значительное повышение уровня кальция вблизи кальциевых каналов может привести к их закрыванию и ограничению поступления кальция из окружающей среды или клеточных органелл в цитозоль. В результате, как недостаток кальция в цитозоле, так и его избыток может препятствовать росту и развитию микромицетов.

Summary

O.V. Kozlova, A.V. Cheremnyh, S.U. Egorov, F.G. Kypriyanova-Ashina. The effect of various calcium modulating influences on the growth of *Aspergillus awamori*.

The relationship between growth of *Aspergillus awamori* in Vogel medium and cytosolic calcium, depending of the various Ca-modulators, was studied. It was established, that physiological stimuli (hypoosmic shock, increasing of CaCl level in medium) inducing short-time increasing Ca-level in micromycetes cells did not influence the gifs colonies growth, spore forming and gifs morphology. The Ca-antagonists (lanthanum, KP₄ and preparatum VARTA), the effective Ca-channels activity inhibitors, leaded in high concentrations to decreasing of spore forming and micromycetes colony growth. The Ca-agonists (caffeine, A23187 and CPA), inducing biphasic Ca² cell response did not influence the branching of gifs, caffeine had a negative effect on the spore forming. The pharmacological preparatum A23187 induced long calcium flashes leaded to the death of gifs proved by count of alive and dead cells. So, the A23187 ionofore leaded to the death of 50% of the cells, whereas in the caffeine containing medium only 5% cells were dead.

Литература

1. *Ткачук В.А.* Фосфоинозитидный обмен и осцилляция ионов Ca^{2+} // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 1. – С. 47–56.
2. *Крутецкая З.Н., Лебедев О.Е.* Механизмы Ca^{2+} -сигналикации в клетках // Цитология. – 2001. – Т. 43, № 31. – С. 5–32.
3. *Козлова О.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г., Рид Н., Эль-Регистан Г.И.* Анализ Ca^{2+} -ответа мицелиальных грибов на внешние воздействия с использованием рекомбинантного экворина // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 6. – С. 734–740.
4. *Козлова О.В., Егоров С.Ю., Куприянова-Ашина Ф.Г., Рид Н., Эль-Регистан Г.И.* Влияние химического аналога микробных аутоиндукторов анабиоза на Ca^{2+} -ответа мицелиальных грибов // Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 6. – С. 741–750.
5. *Schmid J., Harold F.* Dual role for calcium ions in apical growth of *Neurospora crassa* // J. Gen. Microbiol. – 1988. – V. 134. – P. 2623–2631.
6. *Jackson S.L., Heath I.B.* Effects of exogenous calcium ions on tip growth, intracellular Ca^{2+} concentration, and actin arrays in hyphae of the fungus *Saprolegnia ferax* // Experimental mycology. – 1989. – V. 13. – P. 1–12.
7. *Nelson G.* Development of the recombinant aquaria method and its evaluation for calcium measurement in filamentous fungi. – Edinburgh University, 1999. – P. 59–69.
8. *Vogel H.I.* A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N) // Microbial Genetics Bulletin. – 1956. – V. 51. – P. 107–124.
9. *Oparka K.J., Read N.D.* The use of fluorescent probes for studies in living plant cells // N. Harris, K.J. Oparka (eds.) Plant Cell Biology. A Practical Approach. – Oxford: Oxford University Press, 1994. – P. 27–50.
10. *Robson T., Wiebe M.G., Trinci A.P.* Low calcium concentration induce increased branching in *Fusarium graminearum* // Mycological Res. – 1991. – V. 95. – P. 561–565.
11. *Тарчевский И.А.* Метаболизм растений при стрессе. – Казань: Изд-во ФЭН, 2001. – С. 308–316.

Поступила в редакцию
26.10.05

Козлова Ольга Владимировна – кандидат биологических наук, кафедра микробиологии Казанского государственного университета.

Чермных Антон Владимирович – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

Егоров Сергей Юрьевич – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: Sergey.Egorov@ksu.ru

Куприянова-Ашина Флера Гарифовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биологии Казанского государственного университета.